



Departamento de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

# Implicación fisiopatológica del receptor nicotínico $\alpha 7$ y de su duplicado parcial $\text{dup}\alpha 7$ en sepsis y cáncer de pulmón

Tesis Doctoral

José Luis Cedillo Mireles  
Madrid, 2017



Departamento de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

La Dra. CARMEN MONTIEL LÓPEZ, Catedrática del Departamento de Farmacología y Terapéutica, y el Dr. FRANCISCO ARNALICH FERNÁNDEZ, Catedrático del Departamento de Medicina, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN que, D. **JOSÉ LUIS CEDILLO MIRELES** ha realizado bajo su dirección, el trabajo: “**Implicación fisiopatológica del receptor nicotínico  $\alpha 7$  y de su duplicado parcial dup $\alpha 7$  en sepsis y cáncer de pulmón**”, el cual será presentado como Tesis para alcanzar el grado de Doctor, con Mención Internacional, por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid a 21 de Junio de 2017.

Profa. Carmen Montiel López

Prof. Francisco Arnalich Fernández

*A mi familia*

# Índice



<b>ÍNDICE</b> .....	1
<b>ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
1. RECEPTOR PARA LA ACETILCOLINA: ESTRUCTURA Y TIPOS. ....	13
2. SUBTIPOS DE RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES Y PAPEL FUNCIONAL. ....	16
3. EL nAChR DEL SUBTIPO $\alpha 7$ : DISTRIBUCIÓN Y PAPEL FISIOPATOLÓGICO. ....	19
4. VÍA COLINÉRGICA ANTIINFLAMATORIA Y SUS IMPLICACIONES EN DISTINTAS PATOLOGÍAS. ....	22
5. SEPSIS: EPIDEMIOLOGÍA Y RELEVANCIA CLÍNICA. ....	26
6. CÁNCER DE PULMÓN. ....	30
7. EFECTO DEL CONSUMO DE TABACO EN CÁNCER DE PULMÓN. ....	33
8. IDENTIFICACIÓN DEL DUPLICADO PARCIAL DEL $\alpha 7$ nAChR. ....	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	44
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	46
1. SOLUCIONES, REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO, KITS COMERCIALES Y ANTICUERPOS EMPLEADOS. ....	47
1.1 Soluciones. ....	47
1.2 Medios de Cultivo. ....	47
1.3 Kits comerciales. ....	47
1.4 Reactivos. ....	48
1.5 Anticuerpos. ....	48
2. LÍNEAS CELULARES. ....	49
3. PREPARACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS CÉLULAS A549 Y SK-MES-1 SOBREEXPRESANTES DE Dup $\alpha 7$ . ....	49
3.1 Transfección estable de las células A549 y SK-MES-1 con dup $\alpha 7$ . ....	49
3.2 Inmunocitoquímica de selección de las colonias. ....	50
4. POBLACIÓN DE ESTUDIO EN LOS PACIENTES SÉPTICOS. ....	50
5. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE BIOPSIAS DE PULMÓN. ....	51

6. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LAS DISTINTAS MUESTRAS.....	52
6.1 Extracción de ARN.....	52
6.2 Transcripción Reversa (RT). ....	52
6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa. ....	52
7. MEDICIÓN DE CITOQUINAS Y PROTEÍNAS REACTANTES DE FASE AGUDA.....	54
8. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE FRECUENCIA CARDÍACA (HRV). ....	54
9. ENSAYOS DE TUMOROGENICIDAD <i>IN VITRO</i> .....	55
9.1 Ensayo de Migración por Transwell.....	55
9.2 Ensayo del cierre de la Herida. ....	56
9.3 Evaluación de la proliferación celular. ....	56
9.4 Evaluación de la Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT).....	57
10. ENSAYOS DE TUMOROGENICIDAD <i>IN VIVO</i> .....	58
10.1 Desarrollo tumoral <i>in vivo</i> en animales inmunodeficientes.....	58
10.2 Inmunohistoquímica de los tumores extraídos. ....	58
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	59
<b>RESULTADOS</b> .....	61
1. RESULTADOS EN SEPSIS. ....	62
1.1 Expresión de $\alpha 7$ ARNm en células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos. ....	62
1.2 Variabilidad de los niveles de expresión de $\alpha 7$ ARNm en pacientes sépticos. ....	63
1.3 Características clínicas y demográficas de los pacientes sépticos.....	65
1.4 Los niveles de expresión de $\alpha 7$ ARNm en CMSP de pacientes sépticos se correlacionan directamente el grado de actividad vagal.....	67
1.5 Diferencias en la expresión de $\alpha 7$ ARNm y del tono vagal cardiaco influyen el estado inflamatorio de los pacientes sépticos. ....	69
1.6 Regulación dinámica de la actividad de la vía colinérgica antiinflamatoria (CAP) en pacientes sépticos y su relación con la severidad y la evolución clínica. ....	70
1.7 Expresión del $\text{dup}\alpha 7$ ARNm en pacientes sépticos y su correlación con la expresión de $\alpha 7$ ARNm y con el estado inflamatorio y la severidad de la enfermedad. ....	72
2. RESULTADOS <i>IN VITRO</i> , <i>IN VIVO</i> Y CLÍNICOS EN CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS (NSCLC).....	75

---

2.1 Preparación de colonias con sobreexpresión estable de dup $\alpha$ 7.....	75
2.2 Experimentos <i>in vitro</i> : dup $\alpha$ 7 interfiere con diversos procesos tumorigénicos mediados por el $\alpha$ 7 nAChR en líneas celulares de NSCLC. ....	76
2.3 Experimentos <i>in vivo</i> : la sobreexpresión de dup $\alpha$ 7 frena el desarrollo tumoral en ratones atímicos inyectados con células A549. ....	86
2.4 Resultados Clínicos. ....	90
<b>DISCUSIÓN</b> .....	93
1. RELEVANCIA DE LA VÍA COLINÉRGICA ANTIINFLAMATORIA EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN EN SEPSIS HUMANA: LA EXPRESIÓN DE $\alpha$ 7 ARNm EN CMSP COMO MARCADOR DE LA ACTIVIDAD DE ESTA VÍA. ....	94
2. LA SUBUNIDAD Dup $\alpha$ 7 REGULA NEGATIVAMENTE LA ACTIVIDAD TUMOROGÉNICA MEDIADA POR EL $\alpha$ 7 nAChR EN CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS. ....	100
<b>CONCLUSIONES</b> .....	107
<b>CONCLUSIONS</b> .....	109
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	111

# **Abreviaturas**

<b>ACh</b>	Acetilcolina. Ligando fisiológico de los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos.
<b>AChT</b>	Enzima acetilcolintransferasa.
<b>AD</b>	Adenocarcinoma de pulmón.
<b>APACHE</b>	Índice de gravedad ó severidad de enfermedades (del inglés Acute Physiology and Chronic Health Evaluation).
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero.
<b>CCDV</b>	Canales de $\text{Ca}^{2+}$ voltaje-dependientes.
<b>CAP</b>	Vía colinérgica antiinflamatoria (del inglés Cholinergic Antiinflammatory Pathway).
<b>CICR</b>	Liberación de $\text{Ca}^{2+}$ inducida por $\text{Ca}^{2+}$ (del inglés Calcium-Induced Calcium-Release).
<b>CMSP</b>	Células mononucleares de sangre periférica.
<b>CRP</b>	Proteína C Reactiva (del inglés C-Reactive Protein).
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a lesión ó daño tisular (del inglés Damage-Associated Molecular Patterns).
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol.
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración del fármaco que produce el 50% del efecto máximo.
<b>ECG</b>	Electrocardiograma.
<b>EdU</b>	5-etinil-2' desoxiuridina.
<b>FIO<sub>2</sub></b>	Fracción de oxígeno inspirado.
<b>FRET</b>	Transferencia de Energía entre Fluorocromos.
<b>GB</b>	Glóbulos blancos.
<b>Gy</b>	Gray, unidad del Sistema Internacional utilizada para medir la dosis de radiación ionizante.
<b>HAPs</b>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
<b>HRP</b>	Peroxidasa de Rábano Picante.
<b>HRV</b>	Variabilidad de la frecuencia cardíaca (del inglés Heart Rate Variability).
<b>INR</b>	Relación internacional normalizada del tiempo de protrombina.
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	Receptor del inositol trifosfato.
<b>IRAK-M</b>	Serina/treonina quinasa-M asociada al receptor de interleuquina-1.
<b>JAK2</b>	Tirosina quinasa Janus 2.
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido (endotoxina).
<b>nAChR</b>	Receptores nicotínicos para la acetilcolina.

<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor de transcripción nuclear kappa B.
<b>NNK</b>	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona.
<b>NNN</b>	N-nitrosornicotina.
<b>NSCLC</b>	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (del inglés Non-small Cell Lung Cancer).
<b>PAM</b>	Presión arterial media.
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns).
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Presión arterial de oxígeno.
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PFA</b>	Paraformaldehído.
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol-3-quinasa.
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico.
<b>RMSSD</b>	Raíz cuadrada del valor medio de las diferencias al cuadrado de todos los intervalos R-R sucesivos del electrocardiograma.
<b>RyR</b>	Receptores de Rianodina.
<b>SAA</b>	Proteína Sérica Amiloide A.
<b>SCC</b>	Carcinoma escamoso de pulmón.
<b>SDNN</b>	Desviación estándar de todos los intervalos R-R del electrocardiograma.
<b>SEM</b>	Error estándar de la media.
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino.
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
<b>SIRS</b>	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido único (del inglés Single Nucleotide Polymorphism).
<b>STAT3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (del inglés Signal Transducer and Activator of Transcription 3)
<b>TKI</b>	Inhibidores de tirosina quinasa.
<b>TLR</b>	Receptor de tipo Toll.
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa.
<b>TTPa</b>	Tiempo de tromboplastina parcial activada.
<b>UCI</b>	Unidad de Cuidados Intensivos.
<b>VEF<sub>1</sub></b>	Volumen Espiratorio Forzado.

# Resumen

El receptor nicotínico para la acetilcolina del subtipo  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$  nAChR) presenta una amplia distribución en el organismo. Este subtipo de receptor ha sido identificado en queratinocitos, adipocitos, células inmunes, endoteliales, bronquiales y tumorales, desempeñando importantes funciones en cada una de estas localizaciones. En base a lo anterior, no es extraño que una deficiente actividad del  $\alpha 7$  nAChR, o una reducción del número de receptores, hayan sido implicados en la etiopatogenia de diversos procesos patológicos neuropsiquiátricos (esquizofrenia, trastorno bipolar, Alzheimer, Parkinson), así como en enfermedades inflamatorias y neoplásicas. En el año 1998, Gault y cols identificaron en el cromosoma 15 del genoma humano un nuevo gen híbrido, el *CHRFAM7A*. El híbrido resulta de la combinación de un duplicado parcial del gen *CHRNA7*, que codifica para la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR, con el gen *FAM7A*. Nuestro grupo logró, por primera vez, identificar la función del transcrito del gen duplicado, el *dup $\alpha 7$* , el cual se comporta como un modulador endógeno de la actividad del  $\alpha 7$  nAChR en ovocitos (de Lucas Cerrillo y col., 2011).

Dada la implicación del  $\alpha 7$  nAChR en múltiples procesos patológicos humanos, en este trabajo de Tesis nos planteamos estudiar la actividad de este receptor, y su posible modulación por *dup $\alpha 7$* , en enfermedades de gran importancia clínica como la sepsis, un prototipo de enfermedad inflamatoria extrema, y el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Se ha recurrido a utilizar una combinación de técnicas, incluyendo las de biología celular y molecular, bioquímica, microscopía confocal y técnicas específicas para el estudio de la actividad tumorigénica *in vitro* e *in vivo* de líneas celulares tumorales.

Nuestros resultados derivados del estudio piloto realizado en pacientes sépticos revelan que los que presentan niveles de expresión altos de  $\alpha 7$  ARNm y bajos de *dup $\alpha 7$*  en CMSP muestran un mejor control de la inflamación y mejor pronóstico. Por otro lado, nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* con líneas celulares de NSCLC muestran que la sobreexpresión de *dup $\alpha 7$*  bloquea la progresión tumoral secundaria a la activación del  $\alpha 7$  nAChR por nicotina y NNK. Adicionalmente, los datos obtenidos en biopsias pareadas tumorales y no tumorales de pacientes con NSCLC indican la sobreexpresión del  $\alpha 7$  ARNm y la disminución del *dup $\alpha 7$*  en las muestras tumorales respecto a las no tumorales, lo que refuerza el papel decisivo del  $\alpha 7$  nAChR en el desarrollo tumoral, así como la capacidad moduladora negativa de *dup $\alpha 7$*  en este proceso.



# **Abstract**

The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor ( $\alpha 7$  nAChR) is widely distributed in the human body. These receptors have been identified in keratinocytes, adipocytes, immune, endothelial, bronchial and tumor cells where they perform important physiological functions. Reduced expression, activity, or functionality of this receptor subtype has been implicated in a wide variety of neuropsychiatric disorders such as schizophrenia, bipolar, Alzheimer's and Parkinson's disease as well as in inflammatory and neoplastic disorders. In 1998, Gault et al. identified a new hybrid gene located on chromosome 15 of the human genome known as *CHRFAM7A*. This hybrid gene derives from the partial duplication of the  $\alpha 7$  nicotinic subunit gene, *CHRNA7*, and the genetic element *FAM7A*. Our group was able to identify the function of this gene transcript, named dup $\alpha 7$ , and concluded that it behaves as a dominant-negative inhibitor of the  $\alpha 7$  nAChR function.

Due to the significant importance and implications of  $\alpha 7$  nAChR function in a wide variety of human diseases, in this doctoral thesis we will study its activity and possible modulation by dup $\alpha 7$  in diseases of substantial economic and clinical importance such as sepsis and non-small cell lung cancer (NSCLC). Several experimental approaches have been used including confocal microscopy, biochemical, cellular and molecular biology techniques, as well as others used specifically for the study of *in vitro* and *in vivo* tumorigenic activity.

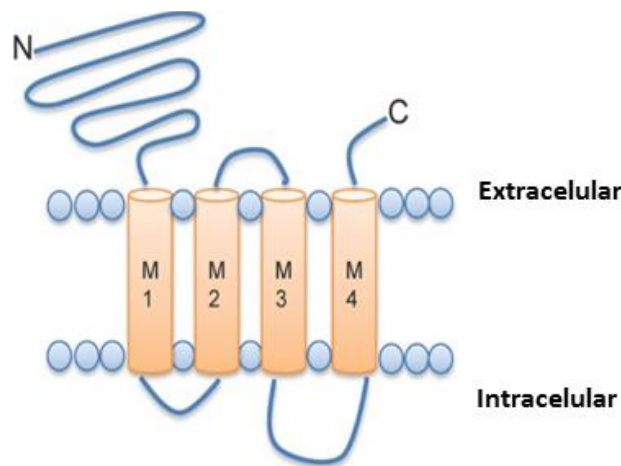
Our results, derived from the pilot-study in septic patients, revealed that patients with a higher expression level of  $\alpha 7$  and lower expression of dup $\alpha 7$  in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) showed improved inflammatory control and a better prognosis of recovery. In contrast, our *in vitro* and *in vivo* data in NSCLC cell lines show that the overexpression of dup $\alpha 7$  blocks the tumoral progression secondary to the activation of the  $\alpha 7$  nAChR by nicotine and NNK. Additionally, our clinical data in healthy and tumoral lung biopsies show that there is an overexpression of  $\alpha 7$  mRNA and a downregulation of dup $\alpha 7$  mRNA in tumor biopsies compared to non-tumoral biopsies. These results reinforce the important role of the  $\alpha 7$  nAChRs in tumor progression and the negative modulatory behavior of dup $\alpha 7$  in tumorigenic activity.

# Introducción

## 1. RECEPTOR PARA LA ACETILCOLINA: ESTRUCTURA Y TIPOS.

Los receptores para la acetilcolina (AChR) pertenecen a la superfamilia de receptores *Cys-loop* activados por ligando. Esta familia de receptores también engloba a receptores de GABA (GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>), glutamato (NMDA, AMPA y kainato), glicina y serotonina (5-HT<sub>3</sub>). Los AChRs, al igual que los demás miembros de la familia, están constituidos por 5 subunidades transmembrana ensambladas alrededor de un poro iónico central. La activación del receptor por el agonista produce un cambio conformacional del mismo con la consiguiente apertura del poro y entrada de cationes a la célula.

La Figura 1 muestra un esquema de la estructura terciaria de una de las subunidades principales que conforman el AChR, la subunidad  $\alpha$ . Se observa un largo segmento N-terminal extracelular, seguido por 3 segmentos transmembrana (M1-M3), un gran bucle intracelular, un segmento transmembrana (M4) y un pequeño segmento C-terminal extracelular (Colombo y col., 2013; de Jonge y Ulloa, 2007).



**Figura 1.** Esquema de la estructura terciaria de una subunidad  $\alpha$  prototipo del receptor nicotínico. Figura modificada de (Hendrickson y col., 2013).

En el dominio N-terminal se localiza el “*Cys-loop*”, el cual contiene 2 residuos de cisteína separados por 13 aminoácidos y unidos entre sí por un puente disulfuro. En este *Cys-loop* reside la función señalizadora del receptor para que se produzca la apertura del poro iónico en respuesta a la unión del agonista (Sine y Engel, 2006). En

este dominio se localiza también el sitio de unión al agonista, sitio que contiene una pareja de cisteínas vecinas cuya presencia es determinante para la fijación del agonista al receptor. El dominio N-terminal posee también diversos sitios de glicosilación, necesarios para la correcta inserción de la subunidad en la membrana plasmática. Estos sitios de glicosilación también intervienen en la correcta formación de puentes disulfuro de este segmento, a la vez que favorecen la isomerización de prolina en la estructura *Cys-loop* (Sumikawa y Gehle, 1992; Rickert e Imperiali, 1995; Gehle y col., 1997).

Los cuatro segmentos transmembrana de la subunidad poseen una conformación de  $\alpha$ -hélice y se disponen revistiendo la pared del poro iónico. El segmento M2 es el responsable de la apertura del poro y de la selectividad y permeabilidad iónica del mismo (Albuquerque y col., 2009; Changeux 2010). El segmento M4 se encuentra enfrentada al M2 y es el principal encargado de interactuar con la membrana plasmática. Los segmentos M1 y M3 se disponen enfrentados entre sí, a 90° de los otros dos segmentos transmembrana (Albuquerque y col. 2009; Changeux, 2010). El dominio intracelular situado entre M3 y M4 está constituido por hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$ , y su longitud y patrón de plegamiento depende del subtipo de subunidad. Este dominio contiene secuencias importantes para el transporte de la subunidad desde el retículo endoplásmico (RE) hacia la membrana celular, además de contener ciertos residuos de aminoácidos que, al ser fosforilados, regulan la eficiencia de ensamblaje del receptor en la membrana y, por tanto, determinan su capacidad funcional (Millar y Harkness, 2008; Colombo y col., 2013).

Las subunidades del AChR se subdividen en dos categorías principales, según contengan sitios de reconocimiento para el ligando endógeno Acetilcolina (ACh) (subunidades  $\alpha$ ) o no contengan estos sitios (subunidades  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ ). Se han identificado 10 genes *CHRNA* (1-10) que codifican para las subunidades  $\alpha$ , 4 genes *CHRNA* (1-4) que codifican para subunidades  $\beta$ , y los genes *CHRNA*, *CHRNA* y *CHRNA* que codifican respectivamente, para las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  del AChR (Colombo y col., 2013). Todas las subunidades son expresadas en humanos, a excepción de la subunidad  $\alpha 8$ , la cual sólo se ha identificado en aves (Millar y Gotti, 2009). Los genes que codifican estas subunidades se localizan en diversos cromosomas del genoma humano, como se puede observar en la Figura 2.

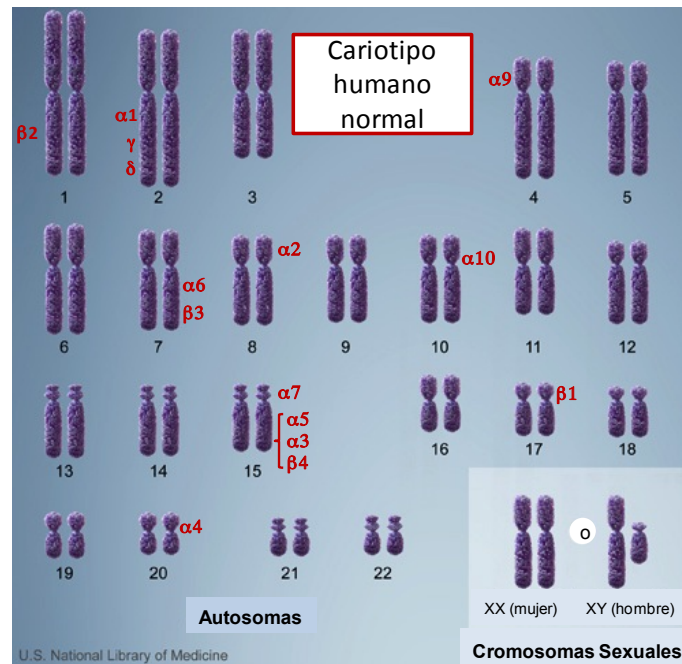
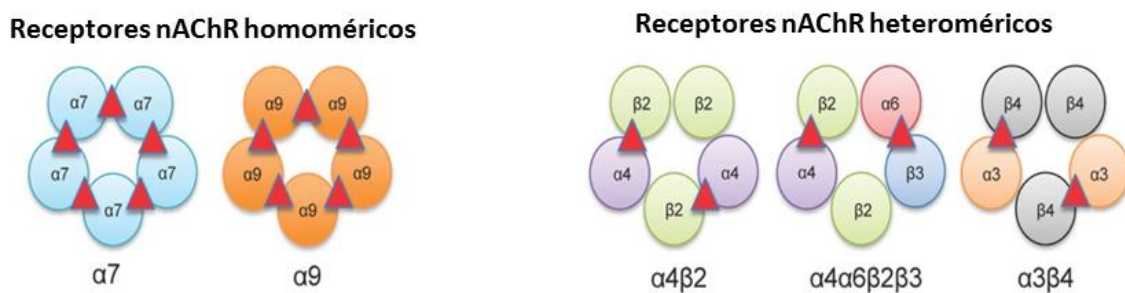


Figura 2. Cariotipo humano ilustrando la localización de los genes que codifican para las diferentes subunidades del receptor nicotínico.

Históricamente, los AChRs se han clasificado en base a su localización, en receptores musculares y neuronales. La extracción y purificación del receptor nicotínico muscular (mAChR) del pez *Torpedo marmorata* permitió, por primera vez, identificar la estructura de esta familia de receptores (Briley y Changeux, 1977; Sobel y col., 1977). El receptor muscular está constituido por las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  [ $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ ] mientras que, en su forma embrionaria, esta última subunidad es reemplazada por la subunidad  $\gamma$  (Brisson y Unwin, 1984; Kubalek y col., 1987). El gen *CHRNA1*, que codifica para la subunidad  $\alpha 1$ , se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 y el gen *CHRNA1*, que codifica para la subunidad  $\beta 1$ , se localiza en el brazo corto del cromosoma 17. Los genes localizados en el cromosoma 2 (*CHRNA1* y *CHRNA2*) y en el cromosoma 17 (*CHRNA1*) codifican para las subunidades  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ , respectivamente (Fig. 2). La sustitución de la subunidad  $\gamma$  por la  $\epsilon$  en la forma adulta del receptor es un paso importante para el desarrollo y generación del músculo durante el crecimiento. Mutaciones en los genes de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\delta$  suelen ser letales, mientras que mutaciones en la subunidad  $\epsilon$  no son detectables hasta que tiene lugar la sustitución de la subunidad  $\gamma$  por la  $\epsilon$ .

## 2. SUBTIPOS DE RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES Y PAPEL FUNCIONAL.

Los receptores nicotínicos neuronales para la acetilcolina (nAChR) pueden ser homoméricos o heteroméricos, según estén constituidos por cinco subunidades idénticas ( $\alpha 7$  o  $\alpha 9$ ), o por combinaciones de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 6$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$ ) (Dani y Bertrand, 2007). Las “ $\alpha$ ” son las subunidades principales del nAChR ya que contienen los sitios de unión al agonista (Karlin y col., 1986) y el control de la apertura del poro iónico en respuesta a la activación del mismo, mientras que las subunidades “ $\beta$ ” son estructurales y dan estabilidad al receptor. Por ello, cada nAChR homomérico dispondría de 5 lugares de unión al agonista localizados en las interfaces de subunidades adyacentes (Palma y col., 1986), mientras que el receptor heteromérico contaría con 2-3 sitios de reconocimiento del agonista en las interfaces entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Taly y col., 2009) (Fig. 3).



**Figura 3. Estequiometría de los diferentes subtipos de nAChRs.** A la izquierda se representan los receptores homoméricos  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$ . A la derecha, los diferentes subtipos de receptores heteroméricos constituidos por distintas combinaciones de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Los triángulos representan los posibles sitios de unión del agonista.

El ligando fisiológico de estos receptores es el neurotransmisor ACh que tras unirse y activar al receptor, induce la entrada de cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) hacia el interior celular. También el precursor de ACh, la colina, puede activar el subtipo  $\alpha 7$  del nAChR (Alkondon y col., 1997). El alcaloide nicotina, del cual deriva la denominación de estos receptores, es otro agonista para los mismos. Para poder producir una activación estable del nAChR, ACh (ó el agonista en cuestión), necesita unirse a dos sitios de unión en receptores heteroméricos mientras que, en receptores homoméricos, debe unirse a tres sitios de unión no consecutivos (Rayes y col., 2009).

La estequiometría de los receptores heteroméricos condiciona la afinidad del receptor por sus agonistas y antagonistas, así como la permeabilidad del poro iónico.

Así, la afinidad por ACh del receptor  $\alpha 4\beta 2$  es alta ( $EC_{50} \approx 1 \mu M$ ) para la estequiometría  $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$  y baja ( $EC_{50} \approx 100 \mu M$ ) para la estequiometría  $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$  (Buisson y Bertrand, 2001; Nelson y col., 2003; Moroni y col., 2006). Con respecto al receptor  $\alpha 3\beta 4$ , sus estequiometrías  $(\alpha 3\beta 4)_2\alpha 3$  y  $(\alpha 3\beta 4)_2\beta 4$  tienen conductancias muy distintas y diferente sensibilidad hacia el ión zinc (Hurst y col., 2013; Zoli y col., 2015).

Los nAChRs de los subtipos  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$  son los mayoritariamente expresados en SNC, mientras que en neuronas del sistema nervioso autónomo se expresan, principalmente, los subtipos  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 7$  del nAChR (Gotti y col., 2009). Cuando el nAChR se localiza presinápticamente, su activación modula la liberación de diversos neurotransmisores, como noradrenalina, dopamina, glutamato y GABA (Paterson y Nordberg, 2000; Zouridakis y col., 2009), mientras que si se localiza postsinápticamente, la activación del nAChR estimula la excitabilidad celular, la diferenciación celular y la supervivencia. La Figura 4 muestra la distribución de los diferentes subtipos de nAChRs en SNC.

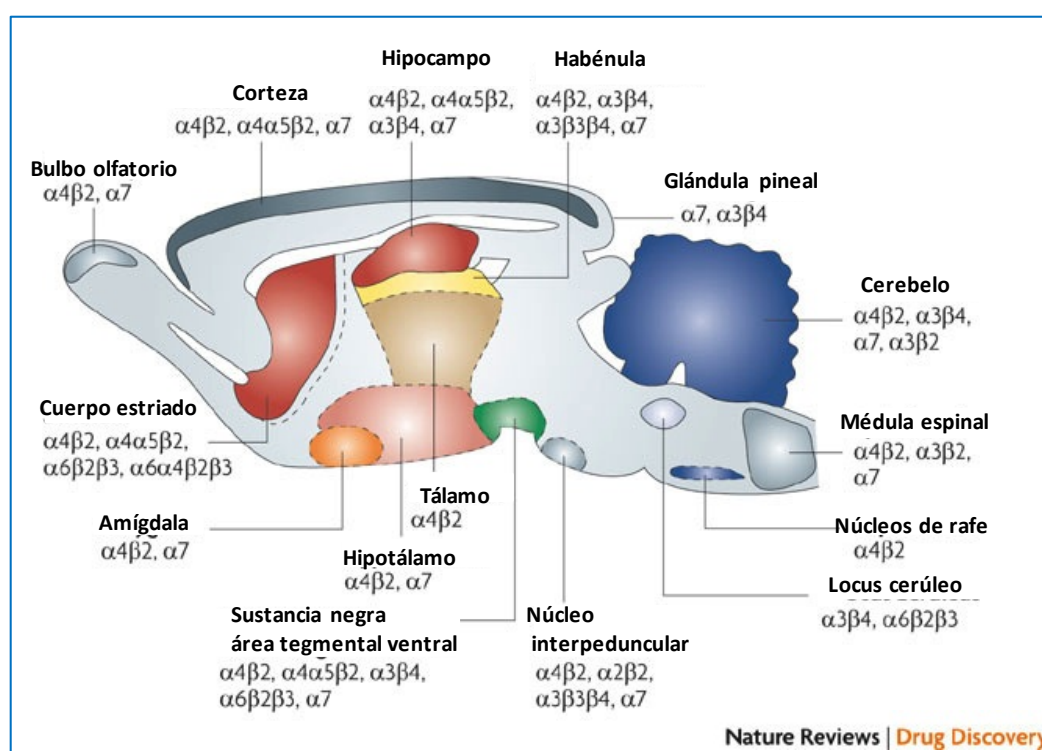


Figura 4. Distribución de los diferentes subtipos de nAChRs en SNC. Imagen modificada de (Taly y col., 2009).



Aunque, las distintas subunidades del nAChR fueron identificadas en sistema nervioso inicialmente, algunas de ellas fueron también encontradas posteriormente en células de naturaleza no neuronal como se detallará en una sección posterior.

### 3. EL nAChR DEL SUBTIPO $\alpha 7$ : DISTRIBUCIÓN Y PAPEL FISIOPATOLÓGICO.

El  $\alpha 7$  nAChR es uno de los subtipos más interesantes por su amplia distribución y por la pleyade de funciones que le han sido atribuidas. Así, su activación en neuronas presinápticas modula la liberación de numerosos neurotransmisores, como dopamina (Champtiaux y col., 2003; Grady y col., 2007; Dickinson y col., 2008), GABA (Li y col., 2001; Zhang y Berg, 2007), glutamato (Gray y col., 1996; Sharma y Vijayaraghavan, 2008) y serotonina. En neuronas postsinápticas, la activación del  $\alpha 7$  nAChR induce impulsos excitatorios, a la vez que favorece la plasticidad neuronal y la supervivencia celular (Anderson y Blobel, 1981; Adler y col., 1998). Dentro del SNC y periférico, el  $\alpha 7$  nAChR es expresado por todos los tipos celulares, tales como neuronas, microglía, oligodendrocitos y astrocitos (Sharma y Vijayaraghavan, 2001; Shytle y col., 2004). Su expresión es especialmente elevada en la zona CA1 del hipocampo y en la corteza entorrinal (Court y col., 2000), mientras que en el cerebelo, su expresión es especialmente alta en células de Purkinje y, con mayor densidad, en la capa granulosa (Court y col., 2000). En corteza motora, el receptor se localiza en neuronas piramidales de las capas II, III, V y VI (Wevers y col., 1994). En los ganglios basales, la expresión del  $\alpha 7$  nAChR es elevada en sustancia negra, intermedia en caudado y putamen y baja en estriado (Court y col., 2000).

Este subtipo de receptor tiene unas características propias que lo diferencian del resto de los nAChRs ya que se desensibiliza rápidamente y su permeabilidad al calcio es elevada, superior a la del receptor de NMDA para glutamato (Castro y Albuquerque, 1995; Quik y col., 1997; Broide y Leslie, 1999). El  $\alpha 7$  nAChR muestra una baja afinidad por ACh mientras que presenta una alta afinidad por el antagonista  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -Bgtx), una toxina producida por la serpiente *Bungarus multicinctus* capaz de bloquear selectivamente a este subtipo de receptor y al receptor muscular  $\alpha 1\beta 1\delta \epsilon$ .

La activación del  $\alpha 7$  nAChR conduce a la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula que es potenciada por diversos mecanismos: 1) entrada de cationes  $\text{Na}^{+}$  por el poro iónico que produce despolarización celular y la consiguiente apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes (CCVD), 2) liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares del RE a través de los receptores de inositol trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ); y 3) liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE

a través de receptores de rianodina (RyRs) por el mecanismo conocido como CICR (del inglés, *calcium induced calcium released*) (Sharma y Vijayaraghavan, 2001). Como resultado de todos los anteriores procesos se produce una elevación considerable de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$  capaz de disparar distintas cascadas de señalización según el tipo celular. Así, en neuronas, la elevación del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  activa la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC), la vía de señalización de MAPK (del inglés Mitogen Activated Protein Kinase) (Vijayaraghavan y col., 1990) y la calmodulina quinasa (CaMK) II (del inglés Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II) (Camarota y col., 2002; Lu y Hawkins, 2006). Todas estas vías confluyen activando (por fosforilación) el elemento CREB (del inglés cAMP response element binding protein) y, por tanto, conducen a un aumento de la plasticidad sináptica a corto y largo plazo. El  $\alpha 7$  nAChR también es capaz de activar ciertas vías de señalización a través del dominio intracelular entre los segmentos transmembrana M3 y M4. Se ha descrito que en ese dominio intracelular existe una región de 4 aminoácidos (345-348 RMKR) que funciona como sitio de unión a proteínas G y, por tanto, capaz de promover la activación de diversas vías de señalización (King y col., 2015; King y Kabbani, 2016).

Tradicionalmente, se ha considerado que el  $\alpha 7$  nAChR es homomérico. Sin embargo, se han identificado receptores heteroméricos  $\alpha 7\beta 2$  funcionales en un modelo de expresión heteróloga, como es el de los ovocitos de rana *Xenopus laevis*; en el que éste receptor heteromérico presenta características farmacológicas distintas al homomérico  $\alpha 7$  (Khiroug y col., 2002). Más recientemente, ha sido posible identificar este receptor heteromérico expresado nativamente en neuronas del prosencéfalo basal (Moretti y col., 2014) y en corteza cerebral humana (Thomsen y col., 2015). Sin embargo, hasta la fecha, el receptor heteromérico  $\alpha 7\beta 2$  no ha podido ser identificado fuera del SNC.

El gen que codifica para la subunidad  $\alpha 7$  es el *CHRNA7*. Este gen es muy primitivo ya que se han encontrado genes homólogos en organismos procariotas del reino de las arqueas (Tasneem y col., 2005). Por ello, se ha considerado al gen *CHRNA7* como el ancestro de los genes que codifican para las subunidades de los receptores de GABA, 5-HT<sub>3</sub> y otras subunidades nicotínicas (Le Novère y col., 2002). El *CHRNA7* se localiza en el brazo largo del cromosoma 15, en una región de gran importancia fisiopatológica (15q13.3). En dicha región se han identificado una gran cantidad de

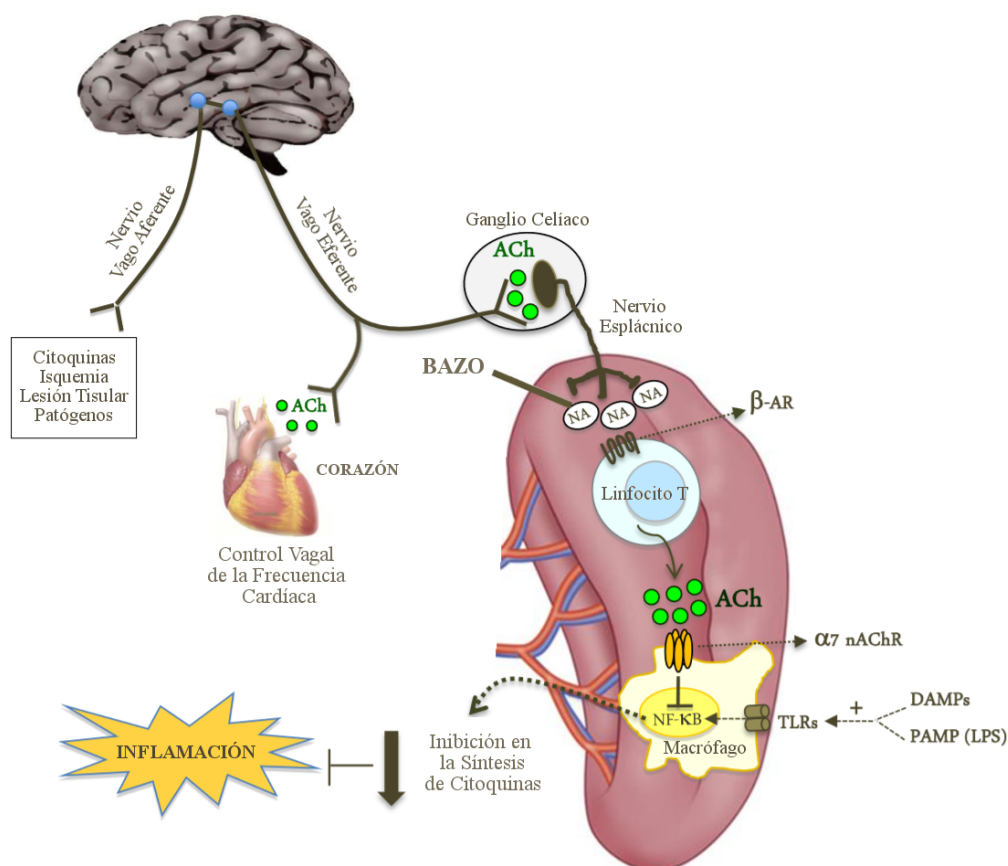
duplicaciones y microdeleciones correspondientes a una amplia variedad de genes que pueden tener relevancia en diversos procesos patológicos, entre los que se incluyen el síndrome de Prader-Willis ó el síndrome de Angelman, la esquizofrenia, la epilepsia, el autismo y el trastorno por déficit de atención por hiperactividad (Szafranski y col., 2010). Así, deleciones en el gen *CHRNA7* se producen, con mayor frecuencia, en pacientes con déficits cognitivos, trastornos del lenguaje y convulsiones, mientras que las duplicaciones en este gen ocurren más frecuentemente en pacientes autistas, con déficit de atención y esquizofrénicos (Gillentine y Schaaf, 2015). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés Single Nucleotide Polymorphism) en el promotor del *CHRNA7* han sido también asociados con la esquizofrenia (Leonard y col., 2002). Finalmente, se ha propuesto que una actividad deficiente del  $\alpha 7$  nAChR o una disminución en la expresión del  $\alpha 7$  ARNm puede estar implicada en diversas patologías neurológicas y psiquiátricas, como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, depresión, trastorno bipolar, autismo y síndrome de Rett (Freedman y col., 1995; Oddo y LaFerla, 2006; Yasui y col., 2011; Kunii y col., 2015).

En conjunto, a la luz de los numerosos datos bibliográficos que se acaban de exponer, podemos concluir que el  $\alpha 7$  nAChR expresado en SNC y periférico tiene una gran relevancia fisiopatológica. Sin embargo, ¿qué es lo que se conoce de este subtipo de receptor en sus localizaciones no neuronales? El  $\alpha 7$  nAChR ha sido identificado en células y tejidos de pulmón (Lam y col., 2007), piel (Zia y col., 2000), inmunes (Borovikova y col., 2000; de Jonge y Ulloa, 2007; de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Olofsson y col., 2012), endotelio (Saeed y col., 2005), plaquetas (Schedel y col., 2011), testículo (Son y Meizel, 2003; Bray y col., 2005), adipocitos (Canello y col., 2012), sinoviocitos (Waldburger y col., 2008), sistema gastrointestinal (Dang y col., 2015; Baird y col., 2016) y en diversos células y tejidos tumorales correspondientes a cáncer de colon, gástrico, vejiga, cervical, hígado y páncreas (Wong y col., 2007; Shin y col., 2008; Chen y col., 2008; Al-Wadei y Schuller, 2009; Calleja-Macias y col., 2009; Martinez y col., 2017). A continuación, revisaremos los actuales conocimientos del papel que juega el  $\alpha 7$  nAChR en algunas de estas localizaciones no neuronales, en concreto en células inmunes y tumorales.

#### **4. VÍA COLINÉRGICA ANTIINFLAMATORIA Y SUS IMPLICACIONES EN DISTINTAS PATOLOGÍAS.**

La vía colinérgica antiinflamatoria (CAP) fue descrita, por primera vez, por el grupo de Kevin Tracey en un trabajo publicado en el año 2000 (Borovikova y col., 2000). En dicho trabajo, los autores mostraron como la estimulación del nervio vago reducía los niveles plasmáticos de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en respuesta a la endotoxina LPS inyectada en ratones. Interesantemente, el efecto inhibitorio de la estimulación vagal no se producía en animales sometidos a vagotomía. Tres años más tarde, los mismos autores demostraron que el  $\alpha 7$  nAChR es el subtipo implicado en el control antiinflamatorio mediado por el nervio vago (Wang y col., 2003), tal como detallaremos más adelante.

El nervio vago se encuentra formado por más de un 80% de fibras aferentes (sensoriales) y un 20% de fibras eferentes (motoras). Este nervio se encarga del control del ritmo cardíaco, la perístasis intestinal, la digestión y la secreción de hormonas por lo que, de su correcta actividad, dependen muchos procesos fisiológicos (Tracey, 2002). Cuando las vías aferentes del nervio vago detectan elementos indicativos de inflamación (citoquinas, LPS, isquemia), estas envían señales al cerebro, concretamente al núcleo del tracto solitario en el bulbo raquídeo (Bonham y Hasser, 1993). Este núcleo conecta con el núcleo dorsal motor que manda señales, a través de las fibras eferentes vagales, al sistema reticuloendotelial (corazón, pulmón, hígado, bazo e intestino). La activación del nervio vago eferente conduce a la liberación de ACh en estos últimos órganos. Una excepción es el bazo, en donde el nervio vago no conecta directamente con este órgano sino que lo hace a través del nervio esplácnico (Fig. 5). De este manera, el vago eferente libera ACh en el ganglio celíaco estimulando el nervio esplácnico, el cual libera noradrenalina (NA) que activa receptores  $\beta$  adrenérgicos de una subpoblación de linfocitos T ( $CD4^+$   $CD44^{high}$   $CD62^{low}$ ). Estos linfocitos, que cuentan con la enzima colinacetiltransferasa (AChT), son capaces de sintetizar y liberar ACh y, por tanto, activar  $\alpha 7$  nAChRs de macrófagos residentes del bazo para frenar la excesiva inflamación (Rosas-Ballina y col., 2011).



**Figura 5. Representación esquemática de la vía colinérgica antiinflamatoria (CAP).** La activación de las vías aferentes del nervio vago por mediadores inflamatorios pone en marcha la respuesta vagal eferente para contrarrestar el exceso de inflamación. El  $\alpha 7$  nAChR juega un papel esencial en este control antiinflamatorio.  $\beta$ -AR: receptores  $\beta$  adrenérgicos; TLRs: receptores de tipo Toll; DAMPs: patrones moleculares asociados a daño; PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos; LPS: lipopolisacárido. Imagen modificada de (Cedillo y col., 2015).

El  $\alpha 7$  nAChR es clave para la actividad de la CAP ya que la activación en macrófagos de este receptor por ACh o nicotina inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias y mejora la supervivencia en modelos animales de sepsis (Wang y col., 2004). Otros agonistas del  $\alpha 7$  nAChR, como colina y el compuesto GTS-21, tienen efectos antiinflamatorios similares a lo observado *in vitro* en modelos animales (Pavlov y col., 2007; Parrish y col., 2008b). Por otra parte, se ha contrastado que el efecto colinérgico antiinflamatorio desaparece cuando el  $\alpha 7$  nAChR es bloqueado con un antagonista o en modelos animales knockout para este subtipo de receptor (Wang y col., 2003; Zhao y col., 2012; Olofsson y col., 2012).

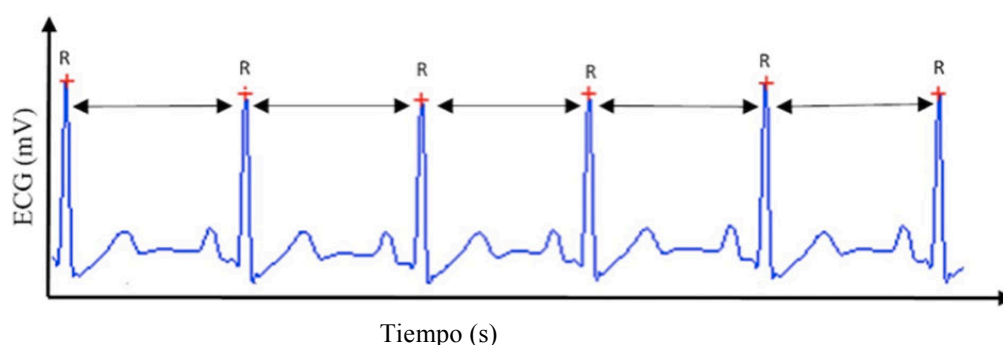
El efecto antiinflamatorio mediado por el  $\alpha 7$  nAChR se produce, principalmente, a través de la vía de señalización JAK2/STAT3. La estimulación del receptor activa la tirosina quinasa Janus 2 (JAK2), la cual fosforila al factor de transcripción STAT3 (de Jonge y col., 2005). El STAT3 activado se dimeriza y transloca al núcleo, donde actúa

como un regulador negativo de la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6) (de Jonge y col., 2005; Arredondo y col., 2006). La forma activa de STAT3 puede también dimerizar con la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B, bloqueando la activación de este último factor de transcripción y, por tanto, inhibiendo la expresión de citoquinas y moléculas proinflamatorias (Yoshida y col., 2004; Hoentjen y col., 2005). Otros grupos de investigación han implicado también a la vía de señalización PI3K/Akt en el efecto antiinflamatorio y mejoría de la supervivencia en sepsis mediados por el  $\alpha$ 7 nAChR (Tyagi y col., 2010; Kim y col., 2014).

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la activación del  $\alpha$ 7 nAChR en macrófagos humanos produce un aumento en los niveles de expresión del ARNm y proteína de IRAK-M (Quinasa-M asociada al receptor de interleuquina-1) (Maldifassi y col., 2014). IRAK-M actúa como un modulador negativo de los TLRs (receptores de tipo Toll). Estos últimos receptores son responsables de detectar las moléculas conocidas como PAMPs (Patrones moleculares asociados a patógenos) y activar señales inflamatorias a través del NF- $\kappa$ B. Así, el aumento de los niveles de IRAK-M mediado por la activación del  $\alpha$ 7 nAChR modula negativamente a los TLRs y, a través de las vías de señalización JAK2/STAT3 y PI3K/Akt, previene la activación de NF- $\kappa$ B. Por tanto, nuestros hallazgos revelan una nueva vía de señalización implicada en el efecto antiinflamatorio mediado por el  $\alpha$ 7 nAChR.

El control de la inflamación por la CAP ha podido constatar en varios modelos animales de enfermedades que cursan con inflamación, como la sepsis, enfermedad inflamatoria intestinal, pancreatitis, shock hemorrágico y lesión pulmonar aguda (van Westerloo y col., 2006; Wang y col., 2007; Parrish y col., 2008a; Li y col., 2010; Meregnani y col., 2011; Kessler y col., 2012; Levy y col., 2013). En algunos de estos modelos, se ha observado una disminución de la actividad del nervio vago, la cual se deduce por la disminución de ciertos índices de la variabilidad de la frecuencia cardíaca (HRV, del inglés Heart Rate Variability) que son controlados por el nervio vago que inerva el corazón (Fig. 5). La HRV es un proceso fisiológico resultante de la actividad equilibrada entre el sistema nervioso simpático y parasimpático sobre el nodo sinusal del corazón. Por tanto, la determinación de varios parámetros de la HRV permite deducir la actividad del sistema nervioso autónomo y, particularmente, del nervio vago (Kuo y col., 2005; Vanderlei y col., 2009).

La medida de diversos parámetros relacionados con la frecuencia cardíaca, utilizando los intervalos R-R del complejo QRS del electrocardiograma (ECG), constituye un método simple y no invasivo (Fig. 6) que permite calcular múltiples variables de tiempo y frecuencia, así como la actividad vagal. Los parámetros que se usan como índices de actividad vagal son los siguientes: 1) SDNN = desviación estándar de todos los intervalos R-R; 2) RMSSD = raíz cuadrada del valor medio de las diferencias al cuadrado de todos los intervalos R-R sucesivos; y 3) HF = parámetro espectral de alta frecuencia referido a la frecuencia de los intervalos R-R entre los rangos 0,15 y 0,4 Hz. (Anon, 1996). La disminución de todos estos índices, que refleja una reducción de la actividad vagal, se ha asociado a una mayor concentración de citoquinas proinflamatorias y mayor mortalidad en pacientes sépticos (Pontet y col., 2003; Schmidt y col., 2005; Marsland y col., 2007).



**Figura 6. Electrocardiograma mostrando los intervalos R-R del complejo QRS.** Estos intervalos son utilizados para calcular diversos parámetros de variabilidad de frecuencia cardíaca (HRV) que reflejan la actividad vagal a nivel del corazón. Imagen modificada de (Laborde y col., 2017).

Todos los datos *in vitro* o en modelos animales de diferentes enfermedades inflamatorias indican la importancia de la CAP en el control de la inflamación. Sin embargo, apenas existen estudios clínicos que sustenten la relevancia de esta vía en patologías humanas que cursan con un exceso de respuesta inflamatoria.



## **5. SEPSIS: EPIDEMIOLOGÍA Y RELEVANCIA CLÍNICA.**

La sepsis es una enfermedad grave que cursa con una excesiva respuesta inflamatoria del organismo como respuesta a un proceso infeccioso. La enfermedad puede llegar a ser mortal si no se trata a tiempo y de forma adecuada. Esta patología tiene un gran impacto socio-sanitario, afectando a unos 750.000 pacientes al año en Estados Unidos, con una cifra de 215.000 muertes y un coste anual de unos 17 billones de dólares (Angus y col., 2001; Martin y col., 2003; Chang y col., 2010). En el mundo se calcula que esta enfermedad puede llegar a afectar a 31,5 millones de personas, 19,4 millones de los cuales evolucionan hacia sepsis severa con 5,3 millones de fallecimientos anuales (Fleischmann y col., 2016). Estos últimos datos están probablemente subestimados, si se tiene en cuenta la dificultad de diagnosticar la enfermedad en países subdesarrollados (Becker y col., 2009; Jawad y col., 2012; Fleischmann y col., 2016). En España, la incidencia de sepsis y sepsis severa en la población es alta, habiéndose descrito 212,7 casos de sepsis (entre los años 2008 y 2012) y 87 casos de sepsis severa (entre los años 2006 y 2011) por cada 100.000 habitantes al año. La tasa de mortalidad para la sepsis y sepsis severa en España fue respectivamente del 21,6% y del 46%, para los períodos citados (Bouza y col., 2014; Yebenes y col., 2017).

Desde el punto de vista clínico, la sepsis es difícil de diagnosticar. En el año 1991 se establecieron las bases diagnósticas de la sepsis y del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) gracias a un consenso internacional, que fue actualizado en 2001 (Bone y col., 1992; Levy y col., 2003). En este último consenso se estableció la definición de sepsis como la respuesta inflamatoria sistémica a la infección (probable o documentada). Los criterios diagnósticos de la sepsis se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de la sepsis.

Definición de Sepsis: Respuesta inflamatoria sistémica a una Infección (probable o documentada) con dos de las siguientes variables	
<b>Variables generales</b>	Fiebre ( $>38,3^{\circ}\text{C}$ ) Hipotermia ( $<36^{\circ}\text{C}$ ) Frecuencia cardíaca $>90$ latidos/minuto Taquipnea ( $> 20$ inhalaciones/minuto) Estado mental alterado Edema importante ó equilibrio positivo de fluidos ( $>20$ mL/Kg durante más de 24 horas) Hiperglucemia (Glucosa en plasma $> 140$ mg/dL o $7,7$ mmol/L) en ausencia de diabetes
<b>Variables inflamatorias</b>	Leucocitosis (recuento de glóbulos blancos [GB] $>12.000 \mu\text{L}^{-1}$ ) Leucopenia (recuento de glóbulos blancos [GB] $<4.000 \mu\text{L}^{-1}$ ) Recuento de GB normal con más del 10% de formas inmaduras Proteína C Reactiva (CRP) en plasma $> 2$ SD por encima del valor normal Procalcitonina plasmática $> 2$ SD por encima del valor normal
<b>Variables hemodinámicas</b>	PAS $< 90$ mm Hg; PAM $<70$ mm Hg, o un descenso de la PAS $> 40$ mm Hg en adultos o $< 2$ SD por debajo de lo normal según la edad.
<b>Variables de disfunción orgánica</b>	Hipoxemia arterial ( $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 <300$ ) Oliguria aguda (diuresis $<0,5$ mL/Kg/h, al menos, durante 2 horas con una adecuada reanimación con fluidos) Aumento de creatinina $>0,5$ mg/dL o $44,2 \mu\text{mol/L}$ Anomalías en la coagulación (INR $>1,5$ o TTPa $> 60$ segundos) Íleo (ausencia de borborrismos) Trombocitopenia (Recuento de plaquetas $<100.000 \mu\text{L}^{-1}$ ) Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total plasmática $> 4$ mg/dL o $70 \mu\text{mol/L}$ )
<b>Variables de perfusión tisular</b>	Hiperlactatemia ( $>1$ mmol/L) Reducción en llenado capilar

GB = Glóbulos blancos, CRP = Proteína C Reactiva, PAS = Presión Arterial Sistólica, PAM = Presión Arterial Media,  $\text{PaO}_2$  = Presión arterial de oxígeno,  $\text{FIO}_2$  = Fracción de oxígeno inspirada, INR = Relación Internacional normalizada del tiempo de protrombina, TTPa = Tiempo de tromboplastina parcial activada. Tomado de (Levy y col., 2003).

En ese mismo consenso internacional se definió a la sepsis severa como aquella sepsis asociada a una disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión que responde a la fluidoterapia. La hipoperfusión puede incluir acidosis láctica, oliguria o alteraciones agudas del estado mental. En la Tabla 2 se muestran los criterios diagnósticos de la sepsis severa.

**Tabla 2. Criterios diagnósticos de la sepsis severa.**

**Definición de la sepsis severa = Sepsis que cursa con hipoperfusión tisular o disfunción orgánica**

Hipotensión inducida por la sepsis

Niveles de lactato por encima de los normales de laboratorio

Diuresis  $< 0,5$  mL/Kg/h durante más de 2 horas a pesar de la reanimación adecuada con fluidos

Lesión pulmonar aguda con  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 250$  con ausencia de neumonía como foco de infección

Lesión pulmonar aguda con  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 200$  con neumonía como foco de infección

Creatinina  $> 2,0$  mg/dL (176,8  $\mu\text{mol/L}$ )

Bilirrubina  $> 2$  mg/dL (34,2  $\mu\text{mol/L}$ )

Recuento de plaquetas  $< 100.000 \mu\text{L}^{-1}$

Coagulopatía (INR  $> 1,5$ )

$\text{PaO}_2$ = Presión arterial de oxígeno,  $\text{FIO}_2$ = Fracción de oxígeno inspirada, INR= Relación Internacional normalizada del tiempo de protrombina. Tomado de (Levy y col., 2003).

Si la sepsis severa no es controlada convenientemente, esta puede evolucionar a shock séptico, en el cual el paciente presenta una hipotensión severa y anormalidades de perfusión que no revierten con una fluidoterapia adecuada. Las anormalidades de perfusión pueden incluir una acidosis láctica, oliguria o una alteración mental severa del paciente (Levy y col., 2003).

Las anteriores definiciones han sido revisadas recientemente para mejorar los criterios diagnósticos de los pacientes, adelantar el tratamiento y mejorar su pronóstico. Así, en el año 2015, se celebró la 3ª Conferencia Internacional de Consenso en Sepsis y Shock Séptico. En dicha conferencia se definió a la sepsis como una disfunción orgánica de alta gravedad debida a la respuesta inflamatoria hacia una infección, en donde el sitio al daño orgánico es distinto al sitio de infección. El shock séptico se mantiene como un empeoramiento de la sepsis, en el que aumenta considerablemente la mortalidad y se caracteriza por una hipotensión severa que se mantiene aún con la reanimación adecuada de fluidos (Singer y col., 2016).

Como se ha mencionado anteriormente, la sepsis tiene un gran componente inflamatorio. Éste se genera con la detección por medio de células inmunes, endoteliales y epiteliales de diversos compuestos patógenos y derivados del daño tisular. Tras la unión de compuestos como PAMPs ó DAMPs (Patrones moleculares asociados a daño) al complemento, receptores TLRs ó receptores NLRs (del inglés NOD-like receptors), entre otros, provocan una cascada compleja de señales intracelulares que regulan la inflamación y la inmunidad adaptativa y celular. Estas señales intracelulares también incluyen los factores de transcripción de la vía MAPK, quinasas Janus (JAKs),

transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) y la translocación nuclear del NF- $\kappa$ B al núcleo, entre muchos otros. El sentido y la intensidad de la activación de estas vías de señalización depende totalmente de la clase y cantidad de moléculas detectadas (Tang y col., 2012).

El tratamiento de la sepsis debe ser personalizado de acuerdo con las características clínicas del paciente. No obstante, la elección del tratamiento debe contemplar los siguientes tres aspectos: 1) control de la infección, 2) estabilización hemodinámica y 3) control de la respuesta inflamatoria. El tratamiento de la infección debe de iniciarse lo antes posible, aunque es aconsejable realizar pruebas diagnósticas antes de su inicio. El tratamiento antibiótico ideal debe ser de amplio espectro (Kumar y col., 2010; Micek y col., 2010) y una vez identificado el organismo patógeno, debe ser reevaluado. No obstante, en un 30% de los pacientes sépticos, los cultivos son negativos por lo que el tratamiento antibiótico es empírico (Vincent y col., 2009). La estabilización hemodinámica debe realizarse con el fin de evitar el daño orgánico y shock. La administración de fluidos dependerá del estado del paciente, pero debería iniciarse de forma abundante y reajustarse una vez que el paciente presente un estado más estable (Dellinger y col., 2013; Vincent y col., 2016). Junto a la fluidoterapia, se administrarán agentes vasoactivos para disminuir la hipotensión. Entre estos últimos, se suelen utilizar la combinación de noradrenalina y dobutamina (De Backer y col., 2012; Dellinger y col., 2013).

En lo que respecta al control de la excesiva respuesta inflamatoria en sepsis, éste es un objetivo que la terapia actual no ha llegado a resolver. Se han descrito diversos ensayos clínicos cuyas dianas terapéuticas estaban dirigidas hacia receptores responsables de la respuesta inmune (TLR4, CD14), o al bloqueo de las moléculas inflamatorias (PAMPs, citoquinas, complemento); sin embargo, pocos de estos ensayos han obtenido resultados prometedores. En los últimos años se vislumbraron efectos inmunomoduladores importantes por el bloqueo del componente C5a del complemento y el tratamiento con la interleucina 7 (IL-7) en pacientes sépticos (Mackall y col., 2011; US National Library of Medicine 2016). En base a lo anterior, se puede concluir que el estudio de nuevas dianas y mecanismos moduladores de la inflamación es clave para un tratamiento más eficaz de los pacientes sépticos.

## 6. CÁNCER DE PULMÓN.

El cáncer de pulmón es el cáncer de mayor mortalidad a nivel mundial, siendo responsable de una de cada cinco muertes por cáncer. En el año 2012, se produjeron 1,59 millones de muertes por este tipo de cáncer en el mundo (19,4% de muertes totales por cáncer) y 21.118 en España (29.6% de muertes por cáncer). La incidencia alcanzó 1,8 millones de casos nuevos en el mundo (13% de la incidencia total de cáncer) y de 26.715 casos en España (17,5% los casos totales por cáncer) (Ferlay y col., 2015).

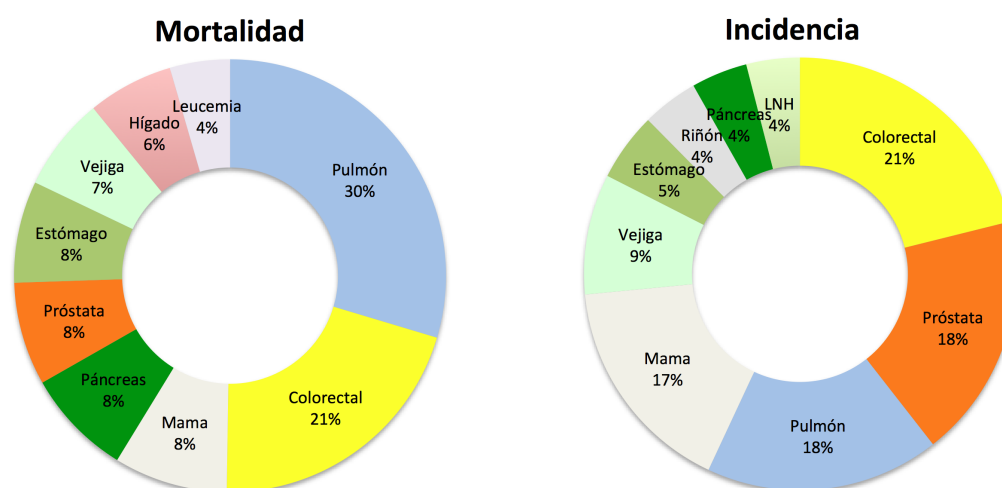


Figura 7. Esquema correspondiente a la incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer en la población española en el año 2012. LNH, Linfoma no Hodgkin. Imagen modificada de (Ferlay y col., 2015).

El cáncer de pulmón presenta a nivel mundial una supervivencia del 10-15% a los 5 años, siendo del 6,3% en España, lo que lo hace uno de los tipos de cáncer más agresivos (Ferlay y col., 2015; Howlader y col., 2016). La supervivencia depende del estadio en el que se realiza el diagnóstico. Así, la probabilidad de supervivencia a los 5 años es del 2% si el diagnóstico del tumor se realiza en el estadio IV, y del 50% si el diagnóstico se produce en una etapa más temprana del desarrollo tumoral, como es el estadio IA (Goldstraw y col., 2007). La baja supervivencia de este tipo de cáncer se debe, en gran medida, a que la mayoría de los pacientes ( $\approx 80\%$ ) son diagnosticados con metástasis, y la mitad de ellos, con metástasis distantes (Howlader y col., 2016).

Existen dos grandes categorías de cáncer de pulmón, el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y el carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC), que representan el 75-85% y el 15-25% de todos los casos de cáncer de pulmón, respectivamente. El SCLC es muy agresivo y su tratamiento, en la mayoría de los casos, es no quirúrgico. Por su parte el NSCLC es tratado por la combinación de cirugía y

terapia adyuvante. Existen varios tipos histológicos dentro del NSCLC, los cuales se recogen en las clasificaciones del 2004 y del 2015. (Travis y col., 2004; Travis y col., 2015). Así, el adenocarcinoma (AD) y el carcinoma de células escamosas (SCC) son los dos tipos histológicos principales del NSCLC, que también incluye el carcinoma de células grandes como tipo histológico minoritario.

El AD es el tipo de cáncer de pulmón más común, representando el 40 % de todos los casos de cáncer de pulmón, el 60% de casos de NSCLC y más del 70% de los tumores reseccionados quirúrgicamente (Lewis y col., 2014; Travis y col., 2015). Este tipo histológico tumoral se define como un tumor epitelial maligno que tiene una diferenciación glandular o producción de mucina y que muestra patrones acinares, papilares, bronquioalveolares o sólidos con crecimiento de mucina, o una combinación de estos patrones. En comparación con los restantes tipos de cánceres de pulmón, el AD tiene un crecimiento más lento y se localiza, generalmente, en la periferia del pulmón (Colby y col., 1995; Fraser y col., 1999; Travis y col., 2015). Su incidencia ha aumentado drásticamente en los últimos años, sobrepasando al SCC debido, probablemente a la modificación en el hábito del consumo de tabaco en la población y al diseño y composición de los cigarrillos que se consumen en la actualidad [National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health 2014]. Aunque muchos de los casos de AD se observan en fumadores, este tipo tumoral es el que se desarrolla mayoritariamente en individuos (especialmente mujeres) que nunca han fumado (Colby y col., 1995; Stellman y col., 1997; Khuder 2001).

El SCC representa el 20% de todos los casos de cáncer de pulmón (Lewis y col., 2014; Travis y col., 2015). Este tipo histológico tumoral se define como un tumor epitelial maligno que muestra queratinización, formación de perlas y/o puentes intercelulares que se originan del epitelio bronquial. Estas características varían con el grado de diferenciación, siendo muy prominentes en los tumores bien diferenciados a ser focales en tumores pobremente diferenciados. Usualmente, el SCC se origina en la parte central del pulmón, en las vías respiratorias principales y en los segmentos bronquiales, pero en los últimos años, la frecuencia de encontrarse en la periferia pulmonar ha aumentado (Funai y col., 2003; Travis y col., 2015). En general, la agresividad de este tipo tumoral suele ser más localizada, ya que tiende a afectar estructuras contiguas vecinas y las metástasis a órganos distantes son mucho menos

frecuentes que con el AD u otros tipos histológicos de cáncer de pulmón. El SCC tiene una tasa de supervivencia mucho mayor que la del AD (siendo comparados en una fase similar). Alrededor de un 80% de los pacientes con SCC en una fase 1 (T1 N0 M0) están vivos a los 5 años tras su diagnóstico, mientras que sólo el 70% de los pacientes de AD sobreviven en este periodo. (Travis y col., 2015).

El tratamiento del NSCLC depende de las características clínicas del paciente y principalmente de la fase y estado del tumor. La primera y mejor opción de tratamiento es la resección quirúrgica del tumor. Esta opción se realiza principalmente en pacientes con un tamaño tumoral adecuado y delimitado (fases tempranas del tumor) y que puedan soportar la extirpación tumoral (National Cancer Institute 2017). La terapia adyuvante se realiza en fases tumorales más avanzadas. Esta incluye la radioterapia y la quimioterapia, cuya elección dependerá igualmente de la fase tumoral y las características del paciente. En la radioterapia se aplica usualmente una dosis de radiación ionizante (usualmente 60-70 Gy fraccionados) a la zona tumoral con el fin de disminuir el tamaño tumoral (Timmerman y col., 2010; National Cancer Institute 2017). La quimioterapia consiste en el tratamiento del tumor mediante el uso de fármacos antineoplásicos, entre los que destacan los siguientes (Naylor, 2016; Naylor y col., 2016; National Cancer Institute 2017):

- Cisplatino (ó Carboplatino). Los platinos son agentes alquilantes que detienen el crecimiento tumoral mediante la formación de enlace cruzados con el ADN.
- Taxanos (Paclitaxel, Docitaxel). Agentes antineoplásicos que actúan sobre los microtúbulos celulares, llevando a la muerte celular.
- Gemcitabina. Compuesto considerado como un antimetabolito, el cual inhibe la síntesis de ácidos nucleicos.
- Pemetrexed. Es un análogo de folatos, por lo que interrumpe los procesos de replicación celular.

En los últimos años, han surgido nuevas terapias que tienen como diana terapéutica las mutaciones en las células tumorales. Los genes que sirven de diana para estos fármacos incluyen a *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *MEK*, entre otros. Así también, recientemente han surgido nuevos fármacos que sirven como inmunoterapia, con el fin de regular el sistema inmune y así, identificar y atacar a las células tumorales. Las dianas que buscan regular estos fármacos incluyen a los receptores PD-1 y CTLA-4 (Naylor, 2016; Naylor y col., 2016; National Cancer Institute 2017).

## 7. EFECTO DEL CONSUMO DE TABACO EN CÁNCER DE PULMÓN.

El tabaco es el mayor factor de riesgo prevenible del cáncer de pulmón, ya que provoca alrededor del 30% de las muertes totales de cáncer y alrededor del 90% de las muertes de cáncer de pulmón (Hecht, 2003; Zon y col., 2009; Tonini y col., 2013).

Alrededor de 1,3 billones de personas en el mundo (20% de la población) fuma algún tipo de tabaco, principalmente cigarrillos (Glynn y col., 2010). En España, durante el año 2012 la proporción de fumadores fue del 33,4% en hombres y del 27,2% en mujeres, frente al 39,1% y 24,6% respectivamente en el año 2001 (World Health Organization 2002, World Health Organization 2015). El tabaco contiene más de 7.000 compuestos, de los cuales al menos 60 son carcinógenos reconocidos [Rodgman y Perfetti 2013; National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health 2014]. La nicotina es el principal componente del tabaco y el responsable de la adicción al mismo, sin embargo, no se le identifica como un cancerígeno establecido. No obstante, otros componentes del tabaco, como las nitrosaminas 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) y N-nitrosonornicotina (NNN), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), aminas aromáticas, fenoles y aldehídos son los componentes responsables de la inducción y formación de aductos de ADN, lo cual llega a causar mutaciones e inestabilidad genética (Hecht, 2003).

Las disfunciones en el gen de supresión tumoral *TP53* (usualmente por mutaciones puntuales) son comunes en todos los tipos de cáncer de pulmón. Estas mutaciones ocurren con gran frecuencia en el SCLC (hasta un 70%), pero en menor medida ocurren en el NSCLC (hasta un 50%). Las mutaciones en este gen ocurren en el 81% de casos del SCC y en el 46% de los casos de AD (Hainaut y Pfeifer, 2016). Mutaciones en el oncogen *KRAS*, son comunes en el AD (alrededor del 30% de los casos), mientras que en SCC estas mutaciones son raras (Matikas y col., 2017). Un 84% de los casos de SCC tienen mutaciones en el gen *EGFR* (Receptor del factor de crecimiento epidérmico) (Franklin y col., 2002). En los tumores con mutaciones en este gen, se pueden utilizar fármacos inhibidores de tirosina quinasa (TKI) como terapia dirigida (da Cunha Santos y col., 2011; Naylor y col., 2016). Anteriormente se consideraba que las mutaciones en el gen *EGFR* y en el gen *KRAS* eran mutuamente excluyentes en el NSCLC (Cardarella y Johnson, 2013), sin embargo, en los últimos

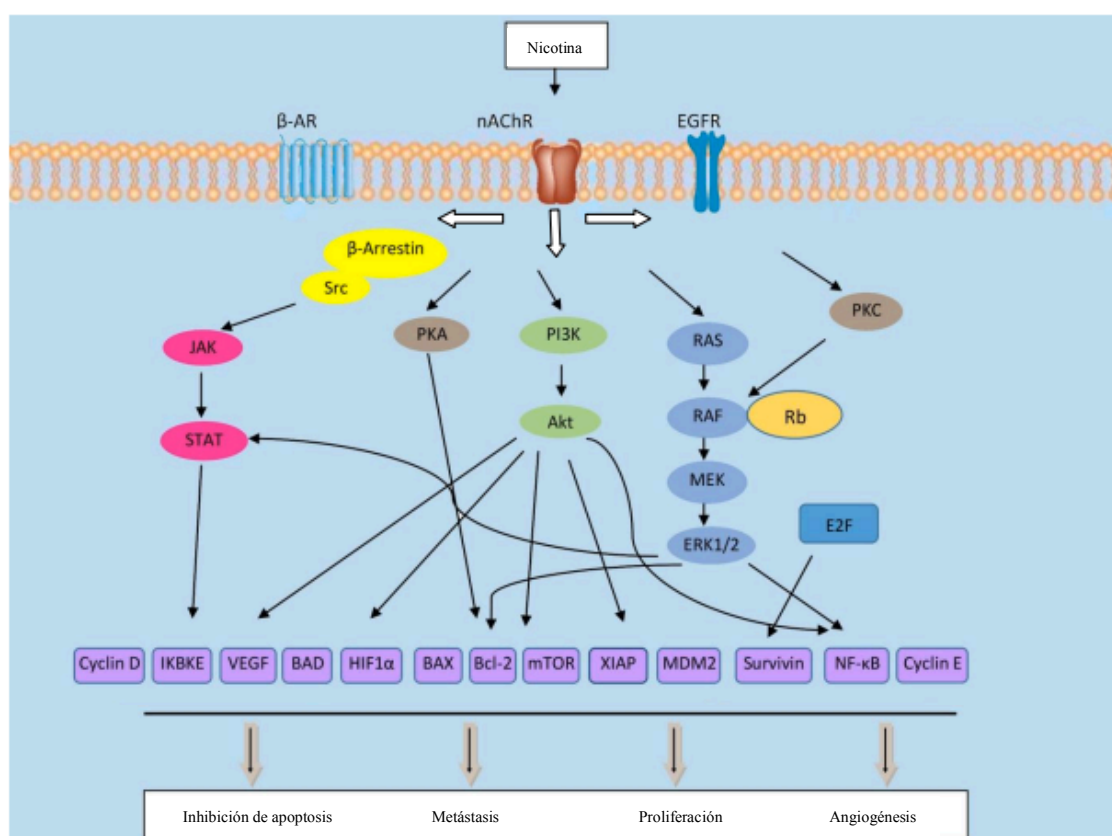


años se ha debatido que esta exclusión no ocurre como se había descrito anteriormente (Lee y col., 2016).

Los componentes del tabaco, la nicotina y las nitrosaminas NNK y NNN, son agonistas nicotínicos. Estos compuestos pueden activar nAChRs y desencadenar diversas vías de señalización promotoras del crecimiento tumoral e inhibitorias de apoptosis. Así, se ha descrito que estos compuestos pueden inhibir la apoptosis inducida por los fármacos antineoplásicos: cisplatino, gemcitabina, paclitaxel y etopósido (Tsurutani y col., 2005; Dasgupta y col., 2006a; Zhang y col., 2009; Warren y col., 2012). También pueden modificar además la farmacocinética y farmacodinámica de los antineoplásicos taxanos, gemcitabina y del TKI erlotinib (Hamilton y col., 2006; de Graan y col., 2012; O'Malley y col., 2013).

Dentro de estas vías de señalización activadas por la acción de la nicotina en los nAChRs, cabe destacar la vía PI3K/Akt. Esta vía es responsable de muchos de los efectos proliferativos y de antiapoptosis inducidos por la nicotina y el NNK, ya que el factor de transcripción Akt regula la fosforilación de proteínas proapoptóticas (inhibiendo a BAD y BAX) (Jin y col., 2004), proteínas antiapoptóticas (activando a Bcl-2) (Heusch y Maneckjee, 1998; Losert y col., 2007) y proliferativas (mTOR y MDM2) (Tsurutani y col., 2005; Nakada y col., 2012). Esta vía de señalización también aumenta la expresión de proteínas antiapoptóticas (XIAP y survivina) (Dasgupta y col., 2006a) y la actividad del NF- $\kappa$ B (Tsurutani y col., 2005). La vía de señalización JAK/STAT participa también en los efectos proliferativos y antiapoptóticos de la nicotina y NNK. Estos componentes provocan la fosforilación del factor de transcripción JAK2 y por consiguiente la de STAT3 (Arredondo y col., 2006; Momi y col., 2013), por lo que regula la expresión de algunos genes de supervivencia (como el oncogen *IKBKE*) (Guo y col., 2013). La activación de la ruta MAPK (Ras-Raf-MEK-ERK) por la nicotina y el NNK estimula la proliferación debido al aumento en los factores de transcripción de supervivencia y de antiapoptosis Fos, Jun y Myc (Codignola y col., 1994; Jull y col., 2001; Jin y col., 2004). Esta misma ruta puede aumentar la migración en un gran número de tipos celulares debida al aumento de marcadores mesenquimales como la fibronectina y HIF-1 $\alpha$ , así como por la disminución de marcadores epiteliales como E-cadherina (Martinelli y col., 2017). Así también se ha descrito que esta vía de señalización lleva a la sobreexpresión del factor STAT3 antes descrito (Arredondo y col., 2006).

Se ha observado también que la vía de señalización de la tirosina quinasa Src, activada a través del reclutamiento de la proteína  $\beta$ -arrestina al nAChR, produce un aumento en la proliferación en células tumorales ya que a través de la fosforilación del factor Src, se llega a activar las vías de señalización PI3K/Akt, MAPK y JAK/STAT, entre otras (Dasgupta y col., 2006b; Pillai y col., 2015). Además de todas estas vías de señalización, la nicotina y el NNK, tras activar a los nAChRs, provocan la liberación de diversos compuestos, que actuando sobre sus propios receptores, permiten exacerbar el efecto proliferativo inicial. Dentro de estos compuestos se encuentran la adrenalina y noradrenalina (actuando sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos) (Al-Wadei y col., 2012a), VEGF (actuando sobre su receptor VEGFR) (Heeschen y col., 2002) y el EGF (actuando sobre el receptor EGFR) (Schuller, 2007; Singh y col., 2011; Pillai y col., 2011). En la Figura 8 se muestra un esquema representando estas vías de señalización y sus interacciones.



**Figura 8. Principales vías de señalización implicadas en la proliferación, migración, angiogénesis e inhibición de la apoptosis mediada por la activación de nAChRs por nicotina en células tumorales de pulmón.** Imagen modificada de (Czyzykowski y col., 2016).

Muchas de las vías de señalización antes mencionadas son activadas por el  $\alpha 7$  nAChR (especialmente el reclutamiento de la  $\beta$ -arrestina y activación de la vía Src). Así, se ha descrito que la activación del  $\alpha 7$  nAChR a través de la nicotina y la nitrosamina NNK tiene importantes efectos en la proliferación, migración, invasión y en la inhibición de apoptosis en líneas celulares de cáncer de pulmón (Jull y col., 2001; Dasgupta y col., 2006b; Eggleton y col., 2008; Dasgupta y col., 2009; Davis y col., 2009; Pillai y Chellappan, 2012; Cardinale y col., 2012; Nakada y col., 2012; Brown y col., 2013), nasofaríngeo (Shi y col., 2012), páncreas (Dasgupta y col., 2009; Al-Wadei y col., 2012c), colon (Wong y col., 2007; Cucina y col., 2012) y gástrico (Shin y col., 2004; Shin y col., 2008; Lien y col., 2011; Wang y col., 2012).

Se ha demostrado que el silenciamiento del  $\alpha 7$  nAChR, ó su bloqueo por medio de antagonistas específicos de este receptor, previene el aumento en la proliferación, migración y angiogénesis debidas a la nicotina ó al NNK (Cattaneo y col., 1993; Codignola y col., 1994; Jull y col., 2001; Zhu y col., 2003; Dasgupta y col., 2006b; Xu y Deng, 2006; Zheng y col., 2007, Davis y col., 2009; Lien y col., 2011; Wang y col., 2012; Shen y col., 2012; Pillai y col., 2015; Zhang y col., 2016).

Así, el  $\alpha 7$  nAChR es el subtipo de receptor nicotínico con el mayor potencial protumorigénico en muchos tipos tumorales, mientras que el receptor  $\alpha 4\beta 2$  es el receptor que inhibe el crecimiento tumoral (modulando la liberación del neurotransmisor GABA) (Schuller, 2009; Al-Wadei y col., 2012b). En condiciones normales, la nicotina tiende a unirse con mayor afinidad al  $\alpha 4\beta 2$  nAChR, sin embargo en fumadores crónicos, este receptor se desensibiliza mientras que la sensibilidad del  $\alpha 7$  nAChR no se modifica, por lo que la exposición crónica de nicotina tiende a promover los efectos estimulantes del  $\alpha 7$  nAChR (Lindstrom y col., 1996; Kawai y Berg, 2001). La afinidad de la nitrosamina NNK por el  $\alpha 7$  nAChR es 1.300 veces mayor que la de la nicotina, por lo que este compuesto puede tener los mismos efectos que la nicotina a concentraciones mucho menores (Schuller y Orloff, 1998).

Aunque el  $\alpha 7$  nAChR es el receptor que más se ha implicado en los procesos tumorales del cáncer de pulmón, se ha descrito también las propiedades protumorigénicas de otros nAChRs en otros tipos tumorales. Así, se ha asociado que la activación del  $\alpha 9$  nAChR homomérico por nicotina en el cáncer de mama tiene importantes efectos en la proliferación y migración de este tipo tumoral (Lee y col., 2010; Guha y col., 2014). El  $\alpha 5$  nAChR heteromérico también ha sido descrito como un

potente modulador protumoral en el cáncer gástrico (Jia y col., 2016). Así también, este último receptor también ha sido estudiado en el cáncer de pulmón pero su función en estas células no está del todo esclarecida, ya que algunos estudios le asignan un papel protumorigénico (Ma y col., 2014) y otros un papel antitumoral (Krais y col., 2011). De hecho, estudios epidemiológicos han observado que variaciones genéticas en los genes para las subunidades nicotínicas  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$  (*CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNA4*), localizados en la región 15q24-25.1, se han asociado con un mayor riesgo a la adicción al tabaco y al cáncer de pulmón (Bierut y col., 2008; Improgo y col., 2010).

De lo anteriormente expuesto se deduce que, los receptores nicotínicos (especialmente el  $\alpha 7$  nAChR) tienen un papel importante en el desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer. Por lo tanto, el estudio de su papel funcional y posible modulación, es de gran interés para intentar mejorar el pronóstico y tratamiento de estas enfermedades.

## 8. IDENTIFICACIÓN DEL DUPLICADO PARCIAL DEL $\alpha 7$ nAChR.

En el año 1998, Gault y colaboradores identificaron en el cromosoma 15, específicamente en la región 15q13.2, un gen similar al gen *CHRNA7* del  $\alpha 7$  nAChR. Este nuevo gen, denominado *CHRFAM7A*, se localiza a 1,6 Mb hacia el centrómero del gen *CHRNA7* y cuenta con los exones 5-10 de este último gen, pero carece de los exones 1-4 del mismo. En su lugar cuenta con los exones E-A del elemento genético *FAM7A*, el cual se encuentra duplicado hasta 4 veces dentro del cromosoma 15. Este elemento *FAM7A* se compone de duplicaciones de los exones A, B, C y E del gen *ULK4* (cromosoma 3p22.1), y de los exones D, F y G del gen *GOLGA8B* (localizado a 2,5 Mb 3' del *CHRNA7*). El gen híbrido *CHRFAM7A* se dispone en sentido inverso con respecto al *CHRNA7* (Gault y col., 1998). La Figura 9 muestra la localización y orientación de ambos genes.

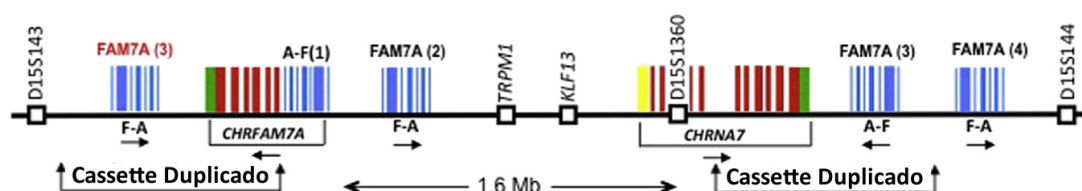


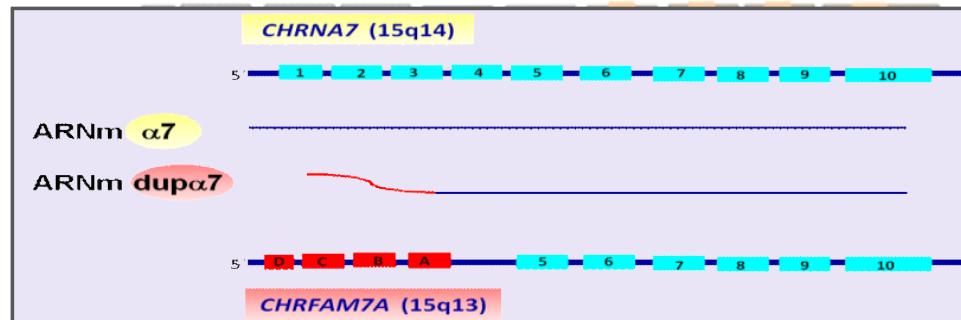
Figura 9. Representación de la localización y organización de los genes *CHRNA7* y *CHRFAM7A* en el cromosoma 15. Imagen modificada de (Sinkus y col., 2015).

La formación de este gen híbrido es relativamente nueva fitogenéticamente, y es exclusiva a la especie humana, ya que no se ha detectado su presencia en roedores ni en otros mamíferos superiores (Locke y col., 2005). Los exones 5-10, los intrones y la región 3'-UTR del gen *CHRFAM7A* tienen una similitud superior al 99% con el gen *CHRNA7*. Existe variación interindividual en el número de copias de este gen. La mayoría de la población tiene dos copias del gen, mientras que el 20% tiene una sola copia y sólo el 1% de la población no cuenta con el gen. Las variaciones del *CHRNA7* son menores, puesto que la mayoría de las personas presentan ambas copias (Sinkus y col., 2015).

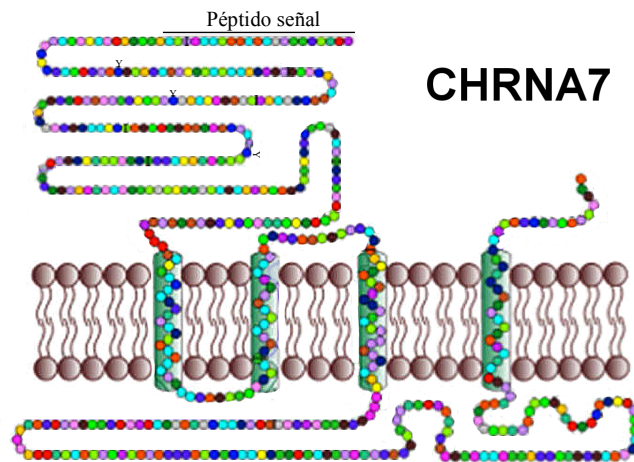
El transcrito del *CHRFAM7A*, conocido como  $\text{dup}\alpha 7$ , se ha localizado en células del sistema nervioso central, inmunes, epiteliales y del sistema gastrointestinal (Villiger y col., 2002; Perl y col., 2006; Severance y Yolken, 2008; van Maanen y col., 2009; de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Benfante y col., 2011; van der Zanden y col., 2012; Kunii y

col., 2015; Dang y col., 2015; Baird y col., 2016; Ramos y col., 2016). Debido a que este gen, sólo cuenta con los exones 5-10 originales del gen *CHRNA7*, este transcrito mantiene todos los elementos responsables de la formación del poro iónico pero carece de la secuencia péptido señal y del sitio de unión al agonista (Fig. 10) (Gault y col., 1998).

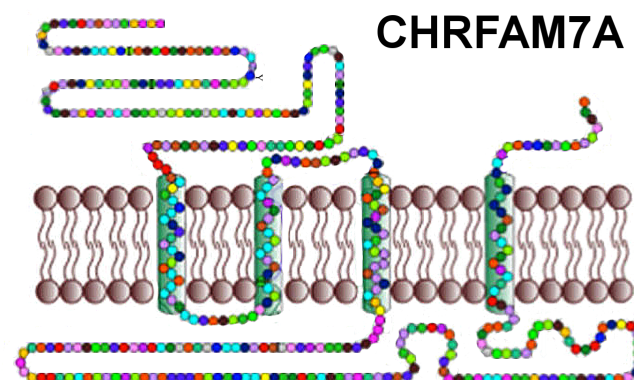
A)



B)



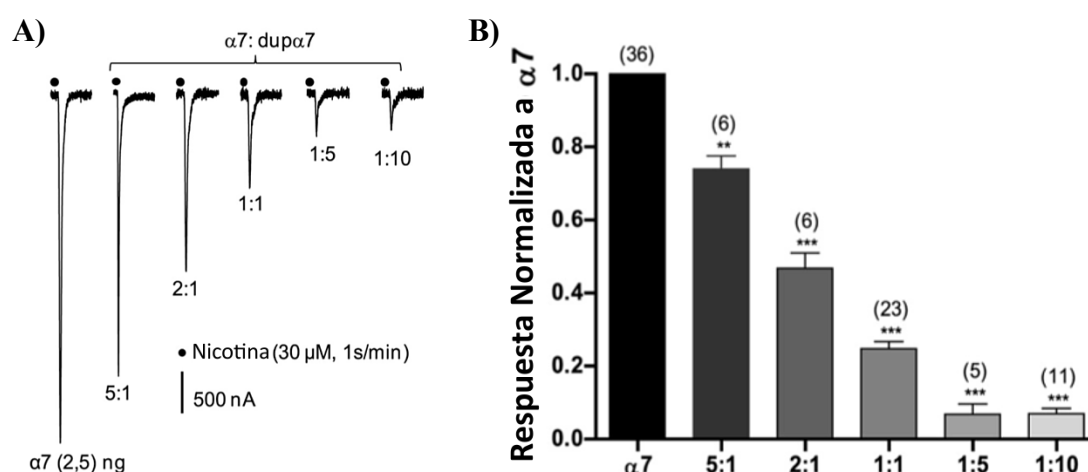
C)



**Figura 10. Representación de la similitud entre los transcritos y proteínas de los genes *CHRNA7* y *CHRFA7A*.** A) Homologías y diferencias entre los exones de ambos genes y sus correspondientes transcritos ( $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$ ). B) La subunidad  $\alpha 7$  normal con sus sitios de glicosilación y péptido señal intactos. C) Subunidad proveniente del transcrito  $\text{dup}\alpha 7$  carente de estos elementos. Imagen modificada de (Sinkus y col., 2015).

En el exón 6 del gen *CHRFAM7A* se identificó una deleción de 2 pb, la cual al ser traducida a proteína daría una secuencia aún más pequeña que la secuencia normal del  $\text{dup}\alpha 7$ . Esto ocurre porque el codón de inicio de este transcrito empieza en un segmento más abajo del  $\text{dup}\alpha 7$  original, por lo que no cuenta con aminoácidos de la secuencia de FAM y sólo 20 aa del  $\alpha 7$  original, por lo que su secuencia sería similar a una subunidad  $\alpha 7$  truncada. Este gen mutado, llamado *CHRFAM7A $\Delta$ 2bp*, está a su vez, en un sentido inverso frente al *CHRFAM7A*, por lo que tiene la misma orientación que el *CHRNA7*. El transcrito de este gen mutado se conoce como  $\text{dup}\Delta\alpha 7$  (Gault y col., 1998). Este gen *CHRFAM7A $\Delta$ 2bp*, esta fuertemente asociado a esquizofrenia e inversamente a la epilepsia general idiopática, sugiriendo que esta mutación puede contribuir al deterioro cognitivo en estos pacientes (Flomen y col., 2006; Sinkus y col., 2009).

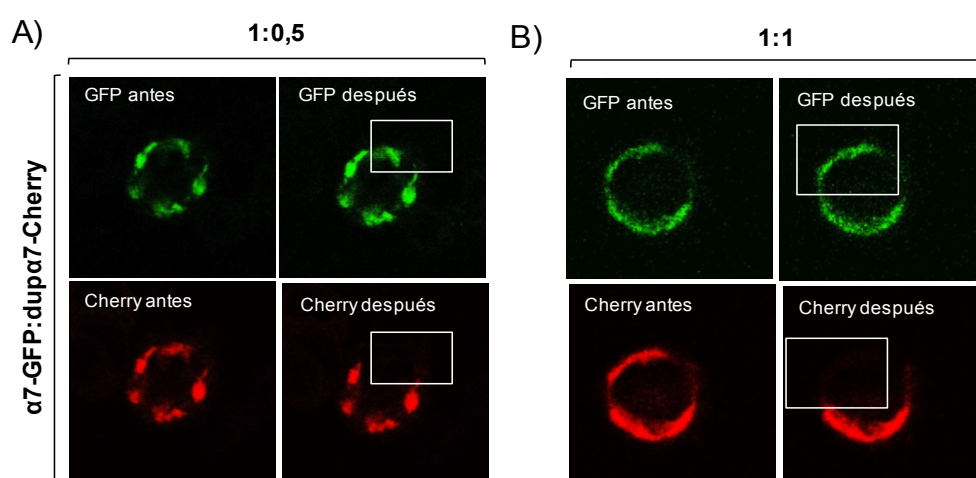
En el año 2011, nuestro grupo identificó el papel funcional del  $\text{dup}\alpha 7$  (de Lucas-Cerrillo y col., 2011), hallazgo que otros han confirmado (Araud y col., 2011). El  $\text{dup}\alpha 7$  se comporta como un modulador endógeno negativo del  $\alpha 7$  nAChR. En nuestro estudio, inyectamos una concentración estable del  $\alpha 7$  y concentraciones crecientes del  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm en un modelo heterologo de *Xenopus laevis* y observamos que al aumentar la concentración del  $\text{dup}\alpha 7$ , disminuía la corriente del  $\alpha 7$  nAChR inducida por nicotina. En la Figura 11 se detallan estos resultados.



**Figura 11. La presencia del  $\text{dup}\alpha 7$  en ovocitos de *Xenopus laevis* tiene un efecto de modulación negativa sobre las corrientes del  $\alpha 7$  nAChR inducidas por nicotina.** A) Picos de corriente originales del  $\alpha 7$  nAChR con concentraciones crecientes del  $\text{dup}\alpha 7$ . B) Gráfico representando la amplitud de corriente normalizada del  $\alpha 7$  nAChR en los distintos grupos de ovocitos con concentraciones crecientes del  $\text{dup}\alpha 7$ . Imagen modificada de (de Lucas Cerrillo y col., 2011).

Tras nosotros, Araud y colaboradores obtuvieron resultados similares pero ellos además observaron que el transcrito  $\text{dup}\Delta\alpha 7$ , con la delección de 2pb en el exón 6, inhibía con mayor potencia la corriente del  $\alpha 7$  nAChR inducida por acetilcolina (Araud y col., 2011).

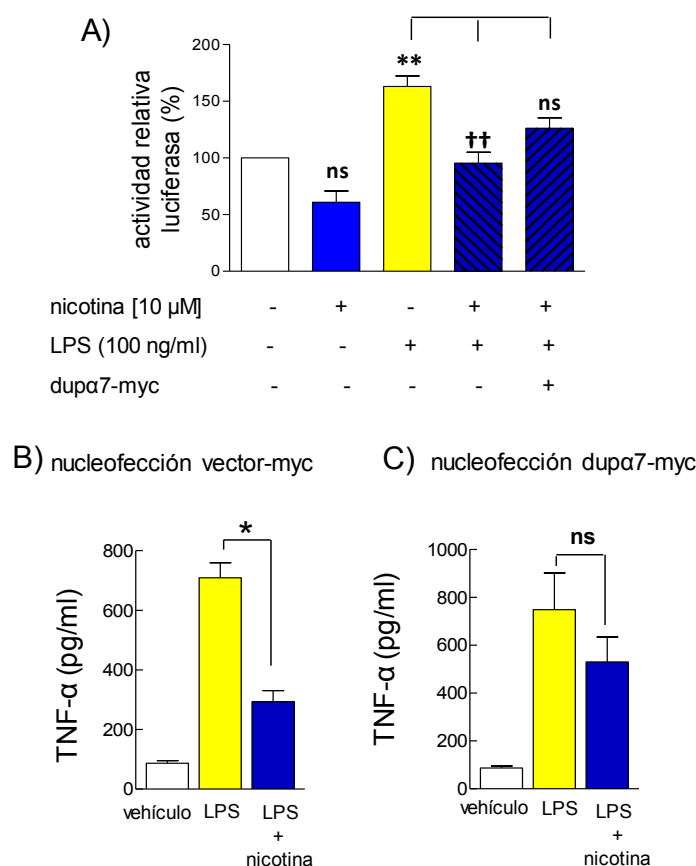
En el año 2014, nuestro grupo demostró la colocalización del  $\text{dup}\alpha 7$  con la subunidad  $\alpha 7$  en membrana de células GH4-C1 mediante la técnica de microscopía confocal FRET (del inglés Förster resonance energy transfer) (Maldifassi 2014). En la Figura 12 se detallan estos resultados.



**Figura 12. Interacción física entre el  $\text{dup}\alpha 7$  y la subunidad  $\alpha 7$  en la membrana celular analizada por FRET por la técnica de fotoblanqueo.** A) Imagen representativa de una célula cotransfectada con  $\alpha 7$ -GFP y  $\text{dup}\alpha 7$ -Cherry en la proporción 1:0,5. B) Imagen representativa de una célula doblemente transfectada con ambas construcciones en una proporción 1:1. La zona señalada por el rectángulo indica la región estudiada. Imagen tomada de (Maldifassi 2014).

En dicho trabajo se confirmó además el papel funcional de modulación negativa del  $\text{dup}\alpha 7$  sobre el  $\alpha 7$  nAChR en macrófagos murinos, en los que encontramos que la sobreexpresión del  $\text{dup}\alpha 7$  inhibió la modulación de la respuesta inflamatoria por parte del  $\alpha 7$  nAChR, con una disminución de la translocación al núcleo del NF- $\kappa$ B y por tanto, una disminución en la secreción de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ . Estos resultados se detallan en la Figura 13 (Maldifassi 2014).





**Figura 13. La expresión de dupα7 revierte parcialmente el efecto antiinflamatorio de nicotina a nivel de NF-κB y de la producción de TNF-α en células RAW264.7.** A) Las células fueron transfectadas con el gen reportero luciferasa con la secuencia para reconocer al NF-κB y algunas con el vector dupα7-myc. Tras 24 horas, se realizó el ensayo reportero de luciferasa en células pre-tratadas o no con nicotina antes y durante el estímulo de LPS. Las células fueron nucleofectadas con el vector-myc vacío (B) o con dupα7-myc (C), e incubadas con LPS, con o sin pre-tratamiento con nicotina. Posteriormente, utilizando técnicas de ELISA, se determinó en el sobrenadante celular la liberación de TNF-α generada por las distintas condiciones experimentales. Imagen tomada de (Maldifassi 2014).

Tras nuestros resultados, en ese mismo año, Wang y colaboradores confirmaron que la coexpresión de dupα7 y la subunidad α7 colocan en la membrana de las células Neuro2a, sin embargo, ellos afirman que el dupα7 (ó el fragmento dupΔα7) junto a la subunidad α7 forman receptores heteroméricos funcionales con respuestas alteradas a colina y vareniclina, además de confirmar que el dupα7 puede interactuar con las subunidades nicotínicas α3 y α4 (Wang y col., 2014).

Recientemente, diversos grupos han estudiado los niveles de expresión del dupα7 ARNm en una gran variedad de tejidos, tales como en el cerebro de pacientes con SIDA (Ramos y col., 2016), y de diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos (esquizofrenia, trastorno bipolar y depresión) (Kunii y col., 2015), así como en biopsias de pacientes con colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y cáncer de colon (Baird y col., 2016), y en células epiteliales intestinales (Dang y col., 2015). Aunque estos trabajos no

abordan el papel funcional del dup $\alpha 7$ , muestran que existe una relación inversa entre la expresión del dup $\alpha 7$  y el  $\alpha 7$  ARNm en esta gran variedad de situaciones, lo que sugiere que en estos modelos existe una cierta modulación del dup $\alpha 7$  sobre el  $\alpha 7$  nAChR.

# Objetivos

El  $\alpha 7$  nAChR es de suma importancia para múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Se ha descrito que este receptor puede modular diversas funciones en enfermedades neuronales, inflamatorias y neoplásicas. Así, se ha observado que la activación de este receptor en células inmunes (dentro de la vía colinérgica antiinflamatoria) conlleva a una disminución en la producción de mediadores inflamatorios por estas células, mientras que en enfermedades neoplásicas, su activación conlleva a una potenciaci3n en las propiedades tumorogénicas de las células tumorales. El duplicado parcial del  $\alpha 7$  nAChR, dup $\alpha 7$ , tiene un papel dominante negativo de la actividad de este receptor en macrófagos murinos y en un modelo heterólogo de *Xenopus laevis*. Sin embargo, su funci3n en enfermedad neoplásica no ha sido identificada aún, ni tampoco su funci3n *in vivo* en una enfermedad con un componente inflamatorio importante como la sepsis.

En este contexto, en este trabajo de Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes OBJETIVOS:

1. Realizar un estudio piloto en pacientes sépticos para evaluar si el nivel de expresi3n del  $\alpha 7$  ARNm, determinado en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), se correlaciona con el nivel de inflamaci3n del paciente y con la evoluci3n de la enfermedad.
2. Determinar, en las CMSP de los anteriores pacientes, si el nivel de expresi3n del dup $\alpha 7$  ARNm se correlaciona con los niveles de expresi3n del  $\alpha 7$  ARNm, con el estado inflamatorio del paciente y con el progreso de la enfermedad.
3. Preparar líneas celulares humanas de NSCLC (A549 y SK-MES-1) con sobreexpresi3n estable de dup $\alpha 7$ .
4. Analizar *in vitro* si la sobreexpresi3n de dup $\alpha 7$  en las anteriores líneas regula negativamente la actividad tumorogénica mediada por el  $\alpha 7$  nAChR.
5. Evaluar *in vivo* el efecto de la sobreexpresi3n de dup $\alpha 7$  sobre el desarrollo tumoral en células A549 inyectadas en los flancos de ratones inmunodeficientes.
6. Evaluar el nivel de expresi3n de los mensajeros de  $\alpha 7$  y dup $\alpha 7$  en biopsias pulmonares tumorales y no tumorales (pareadas) de pacientes con NSCLC para analizar si cambios de expresi3n de los anteriores mensajeros en la muestra tumoral respecto a la no tumoral pueden explicar la elevada asociaci3n de estos tumores con el consumo de tabaco.

# **Materiales y Métodos**

## **1. SOLUCIONES, REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO, KITS COMERCIALES Y ANTICUERPOS EMPLEADOS.**

### **1.1 Soluciones.**

- PBS: NaCl 136 mM; KCl 2 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM; pH=7,4.
- Tampón lisis: NP-40 1%; NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM; pH=8; 1% inhibidores de proteasas, ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro sódico 7 mM, beta-glicerolfosfato 5 mM.
- Tampón de electroforesis: Tris-HCl 2,5 mM; glicina 19,2 mM; SDS 0,1%; pH=8,3.
- Tampón de transferencia: Tris-base 2,5 mM; glicina 19,2 mM; metanol 20%; pH=8,3.
- TBS: Tris-HCl 20 mM; NaCl 136,8 mM; pH=7,4.
- TTBS: Tris-HCl 20 mM; NaCl 136,8 mM; Tween-20 0,1%; pH=7,4.

### **1.2 Medios de Cultivo.**

- Medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen).
- Medio de cultivo MEM (Sigma).
- Medio de cultivo OptiMeM (Gibco, Invitrogen).

### **1.3 Kits comerciales.**

- Click-iT EdU Alexa Fluor 647 (Molecular Probes).
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).
- ECL Select Western Blotting Detection Reagent (Amersham, GE Healthcare).
- RNEasy Mini Kit (Qiagen).
- QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen).
- Taqman Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems).
- iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad).
- Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA).
- C-Reactive Protein ELISA Kit (Cell Biolabs, Inc, CA, USA).
- Serum Amyloid A Human ELISA Kit (Abcam Inc, MA, USA).
- EnVision FLEX System (Dako).

#### **1.4 Reactivos.**

- Antibiótico de Selección G418 (Sigma).
- DAPI (Life Technologies).
- Lipofectamina 2000 (Invitrogen).
- Matrigel (Corning).
- Nicotina (Sigma).
- NNK. 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (Toronto Research Chemicals).
- Paraformaldehído (PFA) (Sigma).
- Poli-L-Lisina (Sigma).
- Prolong Gold Antifade Mountant (Life Technologies).
- Tritón X-100 (Sigma).

#### **1.5 Anticuerpos.**

- Anticuerpo primario monoclonal c-myc (11667145001, Roche).
- Anticuerpo primario monoclonal Vimentina (sc-32322, Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo primario monoclonal Fibronectina (sc-18825, Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo primario monoclonal Actina (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo primario monoclonal Ki67 (M7240, Dako).
- Anticuerpo primario policlonal VEGF (sc-152, Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (R37120, Invitrogen).
- Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con HRP (sc-2033, Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo secundario policlonal anti mouse y conejo conjugado con HRP (P0448, Dako).

## 2. LÍNEAS CELULARES.

En este trabajo de investigación se utilizaron las líneas celulares A549 (ATCC CCL-185) y SK-MES-1 (ATCC HTB-58). La línea celular A549 proviene de un adenocarcinoma pulmonar humano, y fue donada a nuestro laboratorio gracias al Dr. Jaime Renart. La línea celular SK-MES-1 proviene de un carcinoma escamoso pulmonar humano y fue adquirida a través de la empresa ATCC. Las células A549 fueron mantenidas en el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% SFB (Gibco, Invitrogen), 1% GlutaMAX (Gibco, Invitrogen) y 1X Pencilina/Estreptomicina (Sigma). Las células SK-MES-1 fueron mantenidas en el medio MEM (Sigma), suplementado con 10% SFB (Gibco, Invitrogen), 1% Glutamina (Sigma), 1% piruvato sódico (Sigma) y 1X Pencilina/Estreptomicina (Sigma). Ambas líneas celulares se mantuvieron a una temperatura de 37°C y a una atmósfera al 5% CO<sub>2</sub> y con humedad.

## 3. PREPARACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS CÉLULAS A549 Y SK-MES-1 SOBREENPRESANTES DE Dup $\alpha$ 7.

### 3.1 Transfección estable de las células A549 y SK-MES-1 con dup $\alpha$ 7.

El día anterior a la transfección, se sembraron las células A549 y SK-MES-1 a una densidad de 300.000 y 500.000 células respectivamente en placas de 60 mm. Se utilizó el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) para transfectar las células con el plásmido pcDNA3.1myc-dup $\alpha$ 7-His. Brevemente, se mezcló el medio OptiMeM (Invitrogen) y el volumen correspondiente a 8  $\mu$ g del plásmido. Además, se mezcló también el medio OptiMeM y la Lipofectamina 2000 para obtener un ratio 1:2,5 con el plásmido. Tras mezclar estas soluciones, se incubó esta mezcla con las células por un período de 4-6 horas. Transcurrido dicho período, el medio fue sustituido por medio de cultivo fresco en el que se mantuvieron las células por un período adicional de 48 horas. Tras este tiempo, las células fueron tripsinizadas, sembradas en una placa nueva a una dilución 1:20 e incubadas con el antibiótico de selección G418 (600  $\mu$ g/mL)(Sigma) con el fin de obtener solamente aquellas colonias que hayan insertado el plásmido. Tras 2 semanas de incubación con el antibiótico de selección, se procedió a despegar las colonias y expandirlas con el fin de sembrar para la obtención del ARNm y la observación al microscopio confocal.



### 3.2 Inmunocitoquímica de selección de las colonias.

Las células A549 y SK-MES-1 control y sus respectivas colonias fueron sembradas sobre cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina (Sigma) en una placa de 24 pocillos. Tras alcanzar una confluencia del 70-80%, fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 minutos. Después de esto, se procedió a permeabilizar las células con Tritón X-100 (Sigma) al 0,2% durante 20 minutos. Tras la permeabilización, se lavaron las células y se incubaron con el anticuerpo primario anti-myc (Roche), a una dilución 1:200 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, se lavaron las células y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con la sonda fluorescente Alexa Fluor 488 (Invitrogen) a una dilución 1:400 durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el inmunomarcaje, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Prolong Gold Antifade Mountant (Life Technologies). Las muestras fueron visualizadas en el microscopio confocal *Leica TCS SP5* (Servicios Centrales de Microscopía Óptica y Confocal, UAM) y las imágenes tomadas con el programa *Confocal Leica*.

### 4. POBLACIÓN DE ESTUDIO EN LOS PACIENTES SÉPTICOS.

Este estudio fue realizado en el servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario La Paz y fue diseñado de acuerdo a los principios éticos para la investigación médica en humanos (Declaración de Helsinki, 2008) y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del mismo instituto. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado antes de su participación. El grupo de estudio consistió en 33 pacientes no fumadores caucásicos (13 hombres y 20 mujeres; con un rango de edad de 38-80 años [media  $\{\pm SD\}$ ,  $60,3 \pm 12,7$  años]) que fueron admitidos al pabellón de Marzo a Octubre del 2012 y que cumplieron los criterios de diagnóstico de sepsis de acuerdo a las guías internacionales de la campaña de supervivencia de sepsis (Levy y col., 2003). La gravedad de la enfermedad fue evaluada usando el índice APACHE (del inglés Acute Physiology and Chronich Health Evaluation) en el mismo día de su diagnóstico. Los criterios de exclusión para los pacientes sépticos fueron: 1) Enfermedades malignas y trastornos inflamatorios o infecciosos activos crónicos o agudos; 2) insuficiencia cardíaca descompensada, fibrilación atrial ó arritmias cardíacas frecuentes durante los últimos 30 días; 3) enfermedad pulmonar obstructiva crónica ( $VEF_1 < 60\%$ ); 4) tratamiento con inmunosupresores, bloqueantes beta adrenérgicos y

bloqueantes de canales de calcio durante el mes previo al estudio; 5) diabetes mal controlada, fallo renal (creatinina plasmática  $>200$  mmol/L) o hepático (niveles séricos de AST ó ALT  $> 100$  UI/L, tiempo de protrombina  $<60\%$ , niveles totales de bilirrubina  $>60$  mmol/L) y 6) Edad  $>80$  años.

El estudio incluyó además dos grupos adicionales de voluntarios sanos caucásicos: 1) Grupo control, conformado por 33 voluntarios no fumadores (14 hombres, 19 mujeres; rango de edad de 35-78 años [media  $\{\pm SD\}$ ,  $58,3 \pm 11,6$ ]) y que no hayan ingerido ningún medicamento al mes anterior al alistamiento. 2) Grupo de grandes fumadores ( $> 1$  cajetilla/día), conformado por 11 voluntarios sanos (4 hombres, 7 mujeres; rango de edad de 34-58 años) [media  $\{\pm SD\}$ ,  $43,9 \pm 10,2$ ]. Una primera muestra de sangre (15 mL) fue tomada de los pacientes dentro de las primeras 24 horas tras su diagnóstico de sepsis, y también de los voluntarios sanos tras su inclusión en el estudio. Adicionalmente, una segunda muestra fue tomada de los pacientes sobrevivientes en el día de haber sido dado de alta y para algunos pacientes se les tomó dentro de las 24 horas después de haber sido transferidos a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) tras el empeoramiento de su condición clínica.

## 5. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE BIOPSIAS DE PULMÓN.

Biopsias de pulmón de 78 pacientes diagnosticados con NSCLC (40 de carcinoma escamoso y 38 de adenocarcinoma) fueron obtenidas del BioBanco del Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid. Los pacientes fueron sometidos a resección tumoral y disección de los ganglios linfáticos entre Enero 2007 y Junio 2010. Los ejemplares de la biopsias pulmonares tumorales y sanas de cada paciente fueron obtenidas del centro del tumor y de un área distal no infiltrada del pulmón, respectivamente (156 muestras totales). Tras la colección de la muestras, estas fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y categorizadas de acuerdo a la información clínica del Biobanco. La caracterización histológica de NSCLC se basó en la clasificación de tumores de pulmón de la OMS. La última fecha de seguimiento de los pacientes se realizó hasta Julio del 2015. El análisis de estratificación reveló la siguiente distribución: 18 casos estuvieron en una fase IA, 29 en fase IB, 16 en fase IIA y 13 en fase IIB, de acuerdo a la clasificación antes mencionada. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz, Madrid. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado en el que autorizaban el uso

de su muestra para la investigación biomédica. El SCC fue clasificado como pobremente diferenciado cuando los puentes intercelulares y queratinización fue observada en menos del 25% del tumor, mientras que si estos cambios morfológicos eran superiores al 25% el tumor se consideró bien diferenciado. El AD fue clasificado como pobre o bien diferenciado de acuerdo a la presencia de estructuras glandulares en menos o mas del 25% del tumor, respectivamente. La tasa de supervivencia a los 5 años fue definida como el porcentaje de pacientes supervivientes tras 5 años de su cirugía de resección. La supervivencia libre de enfermedad fue definida como la mediana del tiempo (meses) entre la cirugía y la recurrencia del cáncer de pulmón. El intervalo entre las revisiones de seguimiento fue de 3 meses en los primeros 2 años y de 4 meses en los siguientes 3 años.

## **6. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LAS DISTINTAS MUESTRAS.**

### **6.1 Extracción de ARN.**

El ARN fue extraído de las líneas celulares (A549 y SK-MES-1) ó del tejido congelado de biopsias de pulmón usando el kit RNEasy Mini Kit (Qiagen) y de las muestras sanguíneas de controles sanos y de pacientes sépticos usando el kit QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen). En ambos casos, se siguió las instrucciones del comerciante para obtener la mayor cantidad posible de ARN.

### **6.2 Transcripción Reversa (RT).**

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó usando el kit Taqman Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) usando 300 ng de ARN en el caso de las muestras de pacientes sépticos y muestras de biopsias de pulmón y a partir de 1 µg de ARN de las líneas celulares. Se realizó la reacción en un volumen final de 20 µL siguiendo las instrucciones del comerciante.

### **6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa.**

La cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de la subunidad  $\alpha 7$  y del dup $\alpha 7$  se realizó mediante la técnica de PCR cuantitativa. Esta se realizó usando el reactivo iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad), los cebadores respectivos para cada fragmento (incluidos en la Tabla 3) y el ADNc proveniente de la RT. Se utilizó el

equipo 7500 Fast Real Time PCR System. La PCR consistió en un primer paso de 10 minutos a 95°C de activación de la Polimerasa *Taq*, tras el cual siguieron 40 ciclos de un primer paso a 95°C durante 15 segundos para la desnaturalización de la cadena de ADN y un segundo paso a 60°C durante 1 minuto para la hibridación de los cebadores y la extensión de la cadena de ADN por la Polimerasa *Taq*. Tras los ciclos de amplificación, el equipo realizó la curva de “melting” la cual permitió confirmar que los cebadores amplificaron un sólo fragmento. El número de copias absoluto del ARNm de  $\alpha 7$  y *dup $\alpha 7$* , expresados en las muestras sanguíneas de pacientes sépticos y muestras pareadas (sanas y tumorales) de pulmón, fue determinado usando curvas estándar de 6 puntos preparadas con los plásmidos pcDNA3.1 $\alpha 7$  y pcDNA3.1*dup $\alpha 7$ -myc-His* a concentraciones conocidas. La siguiente fórmula fue utilizada con el fin de obtener este parámetro: número de copias = (cantidad \* 6,022x10<sup>23</sup>)/(tamaño\*1x10<sup>9</sup>\*650) (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

En las líneas celulares (A549 y SK-MES-1) y en las muestras de biopsias de pulmón se utilizó el gen de referencia Esterasa D (*ESD*); los genes  $\beta$ -2-Microglobulina ( *$\beta 2M$* ) y Ubiquitina C (*UBC*) se utilizaron para las muestras sanguíneas de controles sanos y pacientes sépticos. Estos genes de referencia fueron utilizados ya que en la bibliografía fueron evaluados como de los mejores genes de referencia y con menor variación en este tipo de muestras (Vandesompele y col., 2002; Saviozzi y col., 2006; Gresner y col., 2009). Con ayuda de los genes de referencia mencionados, se obtuvo el valor normalizado de  $\alpha 7$  y *dup $\alpha 7$*  usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Para las muestras de pacientes sépticos y controles sanos, se utilizó una mezcla de 10 muestras de controles sanos, la cual funcionó como nuestro calibrador en todas las cuantificaciones (a la cual se le asignó el valor 1). En las muestras de biopsias de pulmón, la muestra calibradora fue la propia muestra sana frente a su muestra tumoral correspondiente. La Tabla 3 representa todas las parejas de cebadores utilizadas en nuestro estudio.

Tabla 3. Lista de cebadores utilizados para el ensayo de PCR cuantitativa

Gen amplificado	Secuencia (5'-3')	Tamaño fragmento
<b><i>CHRNA7</i></b>	GCTGCAAATGTCTTGGACAGAT AACAGTCTTCACCCCTGGATAT	70
<b><i>CHRFAM7A</i></b>	CAATTGCTAATCCAGCATTTGTGG CCCAGAAGAATTACCAACACG	102
<b><i><math>\beta</math>2M</i></b>	TGCCTGCCGTGTGAACCATGT TGCGGCATCTTCAAACCTCCATGA	97
<b><i>UBC</i></b>	GTTCCGTCGCAGCCGGGATT TGCATTGTCAAGTGACGATCACAGC	71
<b><i>ESD</i></b>	GCCACCGTAGAATCGCCTAC CCCAAAGCACTTGTTGCTGG	104

Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar al ARNm de los diversos genes de referencia ( *$\beta$ 2M*, *UBC* y *ESD*), la subunidad nicotínica  $\alpha$ 7 (*CHRNA7*) y de su duplicado parcial dup $\alpha$ 7 (*CHRFAM7A*).

## 7. MEDICIÓN DE CITOQUINAS Y PROTEÍNAS REACTANTES DE FASE AGUDA.

Los niveles séricos de las citoquinas de pacientes sépticos fueron medidos usando el Quantikine ELISA Kit (R&D Systems). La proteína C reactiva (CRP) y la proteína sérica amiloide A (SAA) fueron cuantificadas usando los kits de ELISA humanos respectivos (Cell Biolabs y Abcam, respectivamente) de acuerdo a las instrucciones del comerciante. Los niveles de fibrinógeno plasmático fueron determinados por el método coagulométrico de Clauss modificado (Clauss 1957) usando un fibrómetro BBL semiautomatizado (BD Diagnostic Systems).

## 8. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE FRECUENCIA CARDÍACA (HRV).

La función cardíaca autónoma fue evaluada por los dominios de tiempo y frecuencia del análisis HRV de un ECG de 15 minutos, siguiendo los estándares internacionales. El ECG fue realizado dentro de las primeras 12 horas del diagnóstico de sepsis. Las señales de salida del ECG fueron digitalizadas a 1000 Hz por un convertidor A/D (MPI 150WSW, Starter System for Desktop and Notebook Pcs, BIOPAC Systems, Inc). Los últimos 512 intervalos estacionarios R-R fueron usados para calcular la raíz cuadrada de la media de las diferencias al cuadrado de los intervalos sucesivos R-R (RMSSD); este valor, en milisegundos, refleja a todos los componentes cíclicos responsables de la variabilidad. Los datos de ocho pacientes fueron descartados: cinco pacientes tuvieron

latidos ectópicos y tres hipocalemia. Las señales digitalizadas del ECG se usaron para medir los intervalos R-R sucesivos usando el software de detección de la onda R (Matlab 6.5, Math Works Inc) de acuerdo a estándares internacionales (Anon 1996). El poder de la densidad espectral fue calculado usando un algoritmo de transformación rápida de Fourier (Mathcad 11, Mathsoft Inc). El área total bajo la curva corresponde al HRV global y fue calculado al integrar todas las bandas espectrales desde 0,02 a 0,4 Hz. El área bajo la curva de los picos espectrales dentro de los rangos de 0,01 a 0,04; 0,04 a 0,15; 0,15 a 0,4 y de 0,01 a 0,4 fueron definidos como el componente de muy baja frecuencia (VLF), componente de baja frecuencia (LF), componente de fluctuación de alta frecuencia (HF), y el poder total (TP), respectivamente. El componente de muy baja frecuencia (VLF) no fue considerado, ya que refleja la modulación del eje renina-angiotensina-aldosterona al corazón (Stein y Kleiger, 1999; Nunan y col., 2010). La regulación vagal del corazón es un gran contribuidor a la fluctuación del RMSSD y HF, mientras que la fluctuación del LF es modulada por actividades tanto vagal como simpáticas. El ratio LF/HF se usa como un índice del balance vagal-simpático en el corazón (Stein y Kleiger, 1999; Nunan y col., 2010). Los componentes HF y LF pueden ser expresados en milisegundos o en unidades normalizadas ( $nHF = HF/TP$ ;  $nLF = LF/TP$ ), como fue el caso en nuestro estudio.

## **9. ENSAYOS DE TUMOROGENICIDAD *IN VITRO*.**

### **9.1 Ensayo de Migración por Transwell.**

Se sembraron 50.000 células (A549 y SK-MES-1, control y colonias) en la parte superior de una membrana Transwell (Corning) en 100  $\mu$ L de medio sin suero, medio con nicotina (1  $\mu$ M) y medio con NNK (100 nM). En la parte inferior de la membrana se añadió medio al 10% de SFB, el cual actuó como quimioatrayente. Tras 24 horas de migración, se lavaron las membranas con PBS 2 veces y las células se fijaron con Metanol puro durante 20 segundos. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con PBS y se tiñeron con DAPI (1:4.000) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se repitió el paso de lavado y se pasó un bastoncillo por encima de la membrana con el fin de retirar todas las células no migrantes. Se cortó la membrana del pocillo y se montaron con el reactivo Prolong Gold Antifade Mountant (Life Technologies) en un portaobjetos. Se les colocó encima un cubreobjetos y se sellaron las muestras. Las

muestras se observaron en el microscopio confocal *Leica TCS SP5* (Servicios Centrales de Microscopía Óptica y Confocal, UAM) y las células se cuantificaron usando el software ImageJ. El porcentaje de células que migran con el estímulo se calculó respecto al valor obtenido en células no tratadas, el cual fue considerado como el 100%.

## 9.2 Ensayo del cierre de la Herida.

Se sembraron 350.000 células de A549 y 800.000 células SK-MES-1 (y sus respectivas colonias) en placas de 6 pocillos con objeto de obtener máxima confluencia a las 24 h. Tras ese periodo, se le cambió el medio al 0% SFB y se mantuvieron así durante 8 horas. Tras este período, se les realizó la herida usando una punta de pipeta de 100  $\mu$ L. Se lavaron los pocillos con PBS para quitar restos celulares. Se les realizó las fotos al momento 0h de la herida y se les dio los siguientes tratamientos: Basal (medio al 0% SFB), nicotina (100 nM y 1  $\mu$ M), NNK (10 y 100 nM) y positivo (medio al 10% SFB). Tras 24 horas de estímulo, se les realizó las fotos a 24 h. Con ayuda del programa informático ImageJ, se calculó la distancia de cierre de las heridas a los tiempos 0 y 24 h. La fórmula utilizada para calcular el cierre de la herida fue la siguiente: % cierre herida =  $100 - (\text{Distancia 24 h} / \text{Distancia 0 h} * 100)$ .

## 9.3 Evaluación de la proliferación celular.

En una placa de 24 pocillos, se sembraron alrededor de 11.000 células A549 y 17.000 células SK-MES-1 (y sus respectivas colonias). Tras 24 horas de la siembra, se dejaron las células al 0% de SFB durante 24 horas. Después de este tiempo de inanición, se trataron las células con nicotina (1  $\mu$ M) y NNK (100 nM) al 0% SFB, usando 10% SFB como control positivo. Junto a los tratamientos, se incubaron las células con el compuesto EdU (análogo del nucleósido timidina), con el fin de que éste se incorpore al ADN de las células proliferantes. Tras 24 horas de tratamiento, se realizó el protocolo de marcaje de EdU, siguiendo las instrucciones del comerciante. Brevemente, el marcaje se debe a una reacción de cicloadición entre el grupo alquino terminal del compuesto EdU y la azida marcada con la sonda fluorescente Alexa Fluor 647, por lo que sólo las células con ADN de nueva síntesis incorporaran dicha sonda. Tras esto, las células fueron contrateñidas con DAPI (1:4.000), con el fin de observar el total de células. Las preparaciones fueron observadas usando el microscopio confocal *Leica TCS SP5* (Servicios Centrales de Microscopía Óptica y Confocal, UAM) y se cuantificaron con ayuda del programa ImageJ. La fórmula utilizada para calcular el

porcentaje de células proliferantes fue la siguiente: % células EdU positivas = (# células EdU positivas / # células DAPI positivas) \* 100.

#### **9.4 Evaluación de la Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT).**

En placas de 60 mm se sembró alrededor de 200.000 células A549 y 450.000 células SK-MES-1 (y sus respectivas colonias). Tras 24 horas de la siembra, se dejaron las células al 0,5% SFB durante 24 horas. Después de este tiempo de inanición, se trató a las células con nicotina (1 $\mu$ M) y NNK (100nM) al 0,5% SFB.

Después de 48 horas de tratamiento las placas con las líneas celulares se lavaron 3 veces con PBS estéril y a temperatura ambiente. Tras esto, se agregó a las placas el tampón de lisis NP-40 con inhibidor de proteasas al 1%, y las placas se dejaron 30 min sobre hielo en agitación. Tras este tiempo, las placas se rasparon con ayuda de un raspador manual, y el volumen recuperado se mantuvo en movimiento rotacional durante 2 horas a 4°C. Tras esto, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Después de la centrifugación el sobrenadante fue recuperado y su concentración fue cuantificada usando el kit BCA Assay Protein Kit, siguiendo las instrucciones del distribuidor.

Tras los estímulos del EMT, alrededor de 30  $\mu$ g de proteína (por pocillo) fue cargada en un gel de poliacrilamida. Las proteínas se dejaron separar en el gel por medio de las diferencias de carga y peso durante 1 hora a un voltaje de 120 V. Tras esto, las proteínas fueron transferidas a una membrana de Polifluoruro de vinilideno (PVDF), usando un amperaje de 320 mA durante 2 horas y media. Tras la transferencia, las membranas se bloquearon una solución 5% leche descremada en TTBS durante 1 hora. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-Vimentina (1:1.000) y anti-Fibronectina (1:1.000) durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo anti-Actina (1:1.000) se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se lavaron las membranas 3 veces con TTBS durante 15 minutos. Después, se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios anti-ratón (1:5.000) y anti-cabra (1:5.000), ambos conjugados con la peroxidasa de rabano picante (HRP). Tras esto, se lavaron de nuevo las membranas 3 veces con TTBS durante 15 minutos y se revelaron las membranas con la ayuda del reactivo ECL Select Western Blotting Detection Reagent (Amersham, GE Healthcare).



## 10. ENSAYOS DE TUMOROGENICIDAD *IN VIVO*.

### 10.1 Desarrollo tumoral *in vivo* en animales inmunodeficientes.

Todos los procedimientos animales se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Autónoma de Madrid. Las células A549 control y sobreexpresantes de  $\text{dup}\alpha 7$  fueron suspendidas en RPMI-Matrigel (1:1) y un volumen de 100  $\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^6$  células) fue inoculado subcutáneamente en el flanco izquierdo de ratones desnudos atímicos (Sexo: femenino; Edad: 6-8 semanas) para formar un xenoinjerto simple. Los ratones fueron adquiridos de la empresa Charles River, y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en el Animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols–CSIC. Los animales se separaron en 4 grupos de estudio ( $n= 5-6$  animales/grupo) haciendo un total de 22 animales. Una vez transcurridos 10 días de la inyección de las células, a los animales se les administró sacarina (2%) o sacarina con nicotina (1  $\mu\text{M}$ ) en el agua de bebida. El crecimiento tumoral se revisó cada 2-3 días y con ayuda de un calibre, los diámetros tumorales se midieron, y así, el volumen tumoral fue calculado con ayuda de la fórmula:  $(D^2 \times d) \times 0,52$ ; siendo  $D$  = diámetro más largo del tumor y  $d$  = diámetro corto perpendicular a  $D$ . Tras 21 días de que se inició el tratamiento, los ratones fueron sacrificados, y sus tumores fueron extirpados, pesados y una parte del tumor se congeló y la segunda parte se fijó en PFA 4% para su posterior análisis histológico.

### 10.2 Inmunohistoquímica de los tumores extraídos.

Un análisis inmunohistoquímico se realizó en los tumores de animales para determinar la capacidad proliferativa y secretora de VEGF del tumor. Para esto, los cortes histológicos de los tumores se marcaron frente a los anticuerpos anti-Ki67 (Dako) y anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology). La parte tumoral fue fijada en 4% PFA durante 24 horas a temperatura ambiente, tras lo cual, los tejidos se deshidrataron con concentraciones crecientes de Etanol. Tras esto, los tejidos fueron embebidos en parafina por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz. El protocolo de marcaje se realizó siguiendo las instrucciones del kit EnVision FLEX System. En breve, el protocolo fue el siguiente: Secciones de 3,5  $\mu\text{m}$  fueron cortados, y se desparafinizaron en calor a 70°C por 10 minutos. Para el desmascaramiento de antígenos, se calentaron las secciones a 95°C por 20 min en la solución EnVision FLEX

Target Retrieval Solution, Low pH (Dako). Tras este desmascaramiento, las muestras se bloquearon en la solución EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent (Dako) por 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario polivalente de cabra anti- (ratón y conejo) conjugado con HRP por 20 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con la solución sustrato de peroxidasa (EnVision FLEX Substrate Buffer y EnVision FLEX DAB+Chromogen) y contrateñida con hematoxilina (EnVision FLEX Hematoxylin). Las secciones se montaron en portaobjetos con ayuda del reactivo Dako Mounting Medium. Imágenes de las secciones se tomaron en un microscopio invertido Nikon y fueron analizadas en el programa informático ImageJ.

## **11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para observar las diferencias significativas entre diferentes grupos con distribución no paramétricas se usó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunn para ver las diferencias individuales entre los grupos. Para observar las diferencias significativas entre diferentes grupos con distribución paramétrica se usó la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) seguida por la prueba de Bonferroni para observar las diferencias individuales dentro de los grupos. La prueba ANOVA seguida de la prueba de Neuman-Keuls se utilizó para observar las diferencias en el crecimiento tumoral de las líneas celulares en los animales inmunodeprimidos. Se usó la prueba pareada de Wilcoxon para comprobar las diferencias estadísticas en los niveles del  $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm en las muestras de los pacientes sépticos colectadas a diferentes tiempos y en las biopsias tumorales y no tumorales de pulmón pareadas. La prueba t de Student pareada se utilizó para verificar las diferencias estadísticas entre los valores de HRV en las muestras sanguíneas pareadas a distintos tiempos. Las diferencias en los niveles del  $\alpha 7$  ARNm entre los pacientes con sepsis y aquellos con sepsis severa y entre pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes fue calculada usando la prueba de Mann-Whitney y las diferencias en los índices del HRV fueron calculados usando la prueba t de Student no pareada. Esta última prueba se utilizó también para comprobar las diferencias significativas en las propiedades proliferativas y migratorias en las líneas celulares. Las diferencias de sobrevivencia y de estancia en la UCI entre los grupos de pacientes sépticos fue analizado usando la prueba Chi cuadrada. El coeficiente de correlación de

Spearman se utilizó para analizar la correlación entre los niveles del  $\alpha 7$  y dup $\alpha 7$  ARNm de los pacientes sépticos frente a sus correspondientes índices HRV, niveles de citoquinas y proteínas reactantes de fase aguda,. Este coeficiente se utilizó además para calcular la correlación entre los niveles de  $\alpha 7$  frente a sus correspondientes valores de dup $\alpha 7$ . El coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para analizar la correlación entre los índices HRV y sus correspondientes niveles de citoquinas y proteínas reactantes de fase aguda. Los datos son representados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

# Resultados

## 1. RESULTADOS EN SEPSIS.

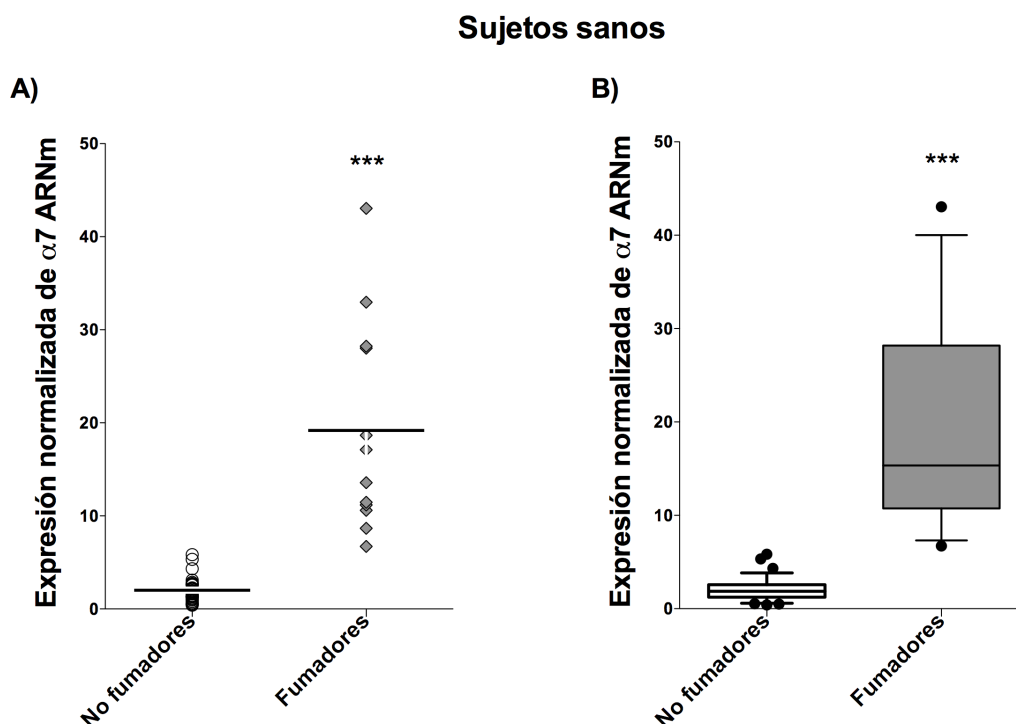
### 1.1 Expresión de $\alpha 7$ ARNm en células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos.

Existen estudios en la literatura determinando los niveles de ARNm de la subunidad  $\alpha 7$  en leucocitos ó células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de sujetos sanos o pacientes con enfermedad de Alzheimer, depresión o esquizofrenia (Lai y col., 2001; Villiger y col., 2002; Perl y col., 2003; Perl y col., 2006; van der Zanden y col., 2012; Costantini y col., 2015; Conti y col., 2016). Desafortunadamente, los cebadores usados para cuantificar el  $\alpha 7$  ARNm en los anteriores trabajos también amplifican el  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm, por lo que los niveles de expresión del  $\alpha 7$  ARNm obtenidos son erróneos. Para sortear este problema, nosotros hemos diseñado dos parejas de cebadores que amplifican específicamente el  $\alpha 7$  o el  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm (Tabla 3). Mientras que la primera pareja de cebadores fueron diseñados para amplificar un fragmento del ADNc del  $\alpha 7$  ARNm situado entre los exones 3 y 4, la segunda pareja de cebadores amplifica una región del ADNc del  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm situada entre los exones A y 5.

Para confirmar que los cebadores diseñados y las condiciones de PCR eran las adecuadas, incluimos en nuestro estudio un grupo de sujetos sanos fumadores cuyos niveles de expresión deberían estar incrementados respecto a los de los sujetos sanos, tal como se ha descrito previamente (van der Zanden y col., 2012). La Figura 14A muestra los valores normalizados de expresión de  $\alpha 7$  ARNm obtenidos en cada uno de los individuos del grupo control y del grupo de fumadores. Cada valor fue obtenido por triplicado y representa el promedio de 3-5 determinaciones independientes. La línea horizontal muestra el valor medio de cada grupo. Se observa un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) del valor medio de expresión del  $\alpha 7$  ARNm en los fumadores ( $19,19 \pm 3,28$ ) respecto a los no fumadores ( $2,02 \pm 0,22$ ). En la Figura 14B se muestran los datos anteriores representados en diagramas de caja-bigotes, en donde la línea media representa la mediana del grupo, el borde superior e inferior de la caja representan los percentiles 75 y 25 y los bigotes los percentiles 90 y 10. Merece la pena destacar la poca variabilidad en la expresión del  $\alpha 7$  ARNm en el grupo control, lo que indica que la edad o el sexo no influyen significativamente en la expresión de este subtipo de receptor. Por el contrario, la variabilidad de expresión del  $\alpha 7$  ARNm es grande en el grupo de

fumadores, lo que sugiere que el tabaco es un agente regulador de la expresión de este mensajero.

En conjunto, los datos anteriores ratifican que la técnica y los cebadores diseñados en nuestro laboratorio es adecuada para cuantificar con garantía la expresión del  $\alpha 7$  ARNm en CMSP.

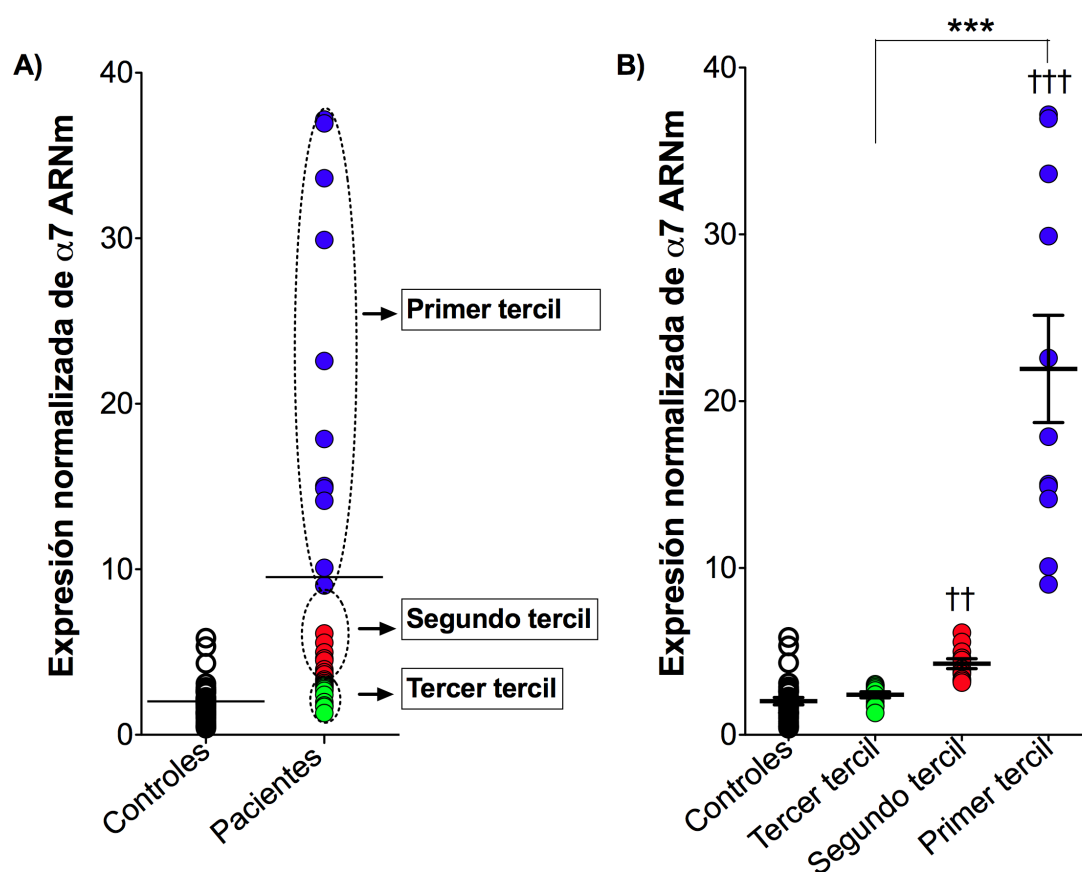


**Figura 14.** Expresión normalizada de  $\alpha 7$  ARNm en sujetos sanos no fumadores y fumadores. A) Datos obtenidos en cada individuo incluido en el estudio. La línea horizontal muestra la media de los valores B) Representación de los datos en diagramas de caja-bigotes.

## 1.2 Variabilidad de los niveles de expresión de $\alpha 7$ ARNm en pacientes sépticos.

Una vez puesta a punto la técnica de qPCR, se procedió a cuantificar los niveles de expresión del  $\alpha 7$  ARNm en CMSP de los pacientes sépticos. La Figura 15A muestra los niveles de expresión normalizada del  $\alpha 7$  ARNm en cada individuo del grupo control (no fumador,  $n=33$ ) y del grupo de pacientes sépticos ( $n=33$ ). La barra horizontal representa la media de expresión de  $\alpha 7$  ARNm en cada grupo; este valor fue significativamente superior en los pacientes ( $9,53 \pm 1,87$ ) que en el grupo control ( $2,02 \pm 0,22$ ). Frente a la poca variabilidad de expresión del grupo control, se observó una gran variabilidad en el

grupo de pacientes. En base a este último resultado, se procedió a distribuir a los pacientes en terciles de acuerdo al nivel de expresión de  $\alpha 7$  ARNm. Así el primer tercil incluyó a los pacientes con niveles de expresión altos, el segundo tercil englobó a los pacientes con expresión media, y el tercer tercil a aquellos con niveles de expresión baja. Los valores promedio de expresión obtenidos en cada uno de los anteriores terciles fueron  $21,38 \pm 3,38$ ;  $4,26 \pm 0,29$  y  $2,40 \pm 0,18$ , respectivamente. La Figura 15B recoge los niveles de expresión del  $\alpha 7$  ARNm de los pacientes distribuidos por terciles. Se encontraron diferencias significativas de expresión entre los terciles primero ( $p < 0,001$ ) y segundo ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo control. También se observaron diferencias significativas entre el primer y el tercer tercil ( $p < 0,001$ ).



**Figura 15. Expresión normalizada del  $\alpha 7$  ARNm en CMSP de sujetos voluntarios sanos no fumadores (controles) y en pacientes sépticos.** A) Valores de expresión individuales obtenidos en 33 controles y 33 pacientes sépticos. B) Comparación de los niveles de expresión de  $\alpha 7$  ARNm en controles y pacientes distribuidos por terciles de acuerdo a sus niveles de expresión (primer tercil, alta; segundo tercil, media; tercer tercil, baja).  $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0,001$  y  $^{\dagger\dagger}p < 0,01$  comparando el tercil con el grupo control.  $^{***}p < 0,001$  comparando el primer y tercer tercil. Figura modificada de (Cedillo y col., 2015).

### 1.3 Características clínicas y demográficas de los pacientes sépticos.

La Tabla 4 muestra las características demográficas y los datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio. Los pacientes se ordenaron, de manera descendente, atendiendo a su nivel de expresión de  $\alpha 7$  ARNm. El agente patógeno fue identificado en 28 de los 33 pacientes (78,3%), teniendo un cultivo negativo los 5 pacientes restantes. No se observaron diferencias significativas entre controles y pacientes, ni entre los terciles, en lo que respecta a la edad o sexo. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas con respecto a los días de hospitalización entre los terciles. Así, el tiempo medio de permanencia en el hospital de los pacientes del primer tercil fue alrededor de 5 días inferior al de los pacientes de los otros 2 terciles. La situación clínica de 13 de los pacientes del estudio progreso hasta sepsis severa en los primeros 2 días tras el ingreso, por lo que estos pacientes fueron trasladados a la UCI. Ningún paciente del primer tercil desarrolló sepsis severa, mientras que 5 (36,3%) y 8 (81,8%) de los pacientes del segundo y tercer tercil, respectivamente, tuvieron que ser trasladados a la UCI. Se observaron diferencias significativas entre los terciles en lo que respecta al índice APACHE II (acrónimo del término inglés Acute Physiology and Chronic Health Evaluation). Así, este último índice fue significativamente mayor en el segundo ( $p < 0,01$ ) y tercer tercil ( $p < 0,001$ ) respecto al primer tercil.



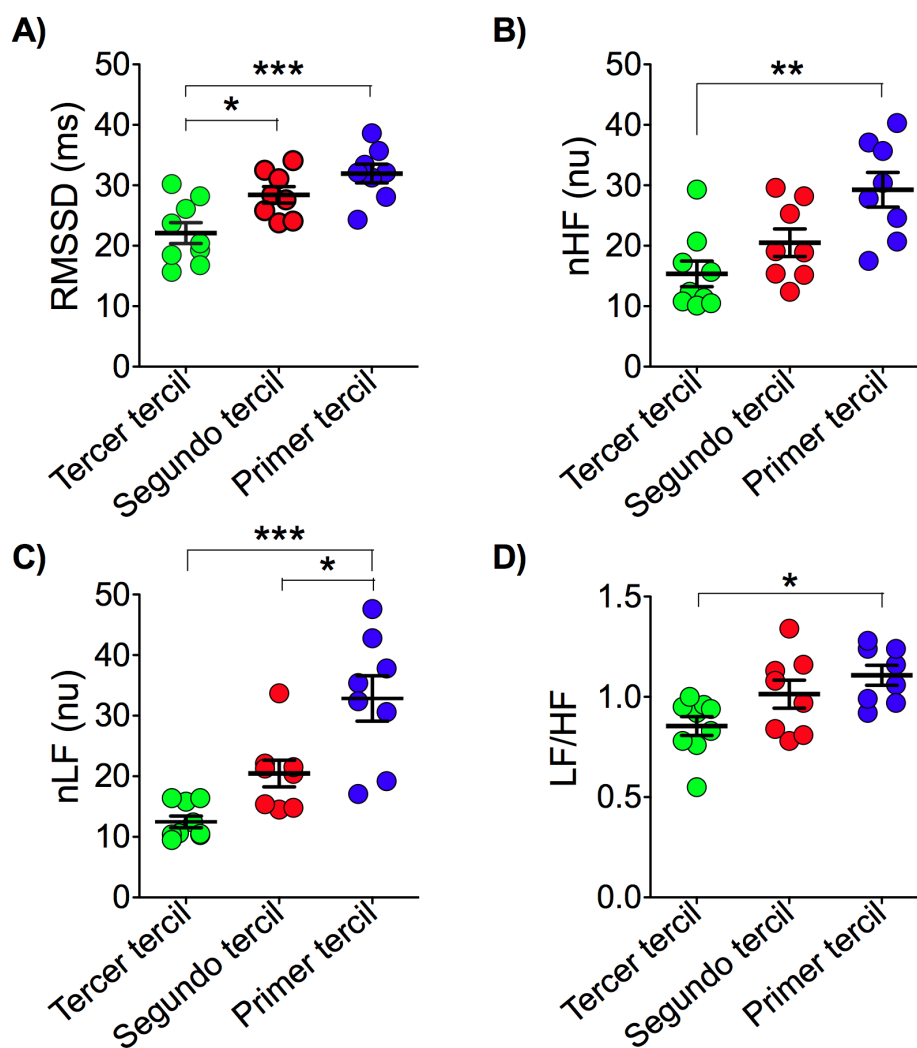
**Tabla 4. Características clínicas y demográficas de los pacientes estratificados por terciles de acuerdo a sus niveles de expresión del  $\alpha 7$  ARNm. Tabla modificada de (Cedillo y col., 2015).**

Paciente	Edad	Sexo	Sitio de Infección	Aislado Clínico	Patógeno	APACHE II	Sepsis Severa	Estancia en Hospital	Muerte
<b>Primer tercil</b>									
# 3	65	M	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	11	No	8	No
# 27	45	M	Pulmón	Espuito, Orina	Negativo	16	No	8	No
# 1	62	F	Pulmón	Espuito, Orina	Negativo	12	No	10	No
# 18	57	F	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	14	No	10	No
# 26	68	M	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	13	No	10	No
# 13	52	F	Pulmón	Espuito, Orina	<i>S. pneumoniae</i> (§)	12	No	9	No
# 31	64	M	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	14	No	11	No
# 6	75	F	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	13	No	10	No
# 33	44	M	Pulmón	Espuito, Orina	Negativo	15	No	8	No
#2	77	M	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	14	No	10	No
# 32	62	F	Pulmón	Espuito, Orina	Negativo	16	No	10	No
61,0 $\pm$ 10,8						13,6 $\pm$ 1,6		9,45 $\pm$ 0,31	
<b>Segundo tercil</b>									
# 4	48	F	AA	Hemocultivo	<i>P. mirabilis</i>	14	No	13	No
# 22	62	M	Pulmón	Espuito, Orina	<i>S. pneumoniae</i> (§)	18	Sí	15	No
# 16	41	F	Pulmón	Espuito, Orina	Negativo	20	Sí	19	No
# 20	62	M	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	17	No	21	No
# 17	49	F	Pulmón	Espuito, Orina	<i>S. pneumoniae</i> (§)	18	Sí	21	No
# 7	78	M	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	14	No	10	No
# 25	41	F	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	12	No	8	No
# 21	67	F	TUS	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	19	No	19	No
# 15	67	F	Pulmón	Hemocultivo	<i>S. pneumoniae</i>	18	No	18	No
# 23	80	M	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	16	No	9	No
# 29	38	M	Pulmón	Espuito, Orina	<i>S. pneumoniae</i> (§)	18	Sí	9	No
57,5 $\pm$ 14,9						16,7 $\pm$ 2,4**		14,73 $\pm$ 1,54**	
<b>Tercer tercil</b>									
# 10	67	F	TUS	Urocultivo	<i>E. coli</i>	17	Sí	11	No
# 9	71	F	Pulmón	Espuito, Orina	<i>S. pneumoniae</i> (§)	15	No	12	No
# 28	45	M	Pulmón	Espuito, Orina	<i>S. pneumoniae</i> (§)	15	No	9	No
# 5	52	F	Pulmón	Hemocultivo	<i>S. pneumoniae</i>	18	Sí	14	Sí
# 24	75	F	Pulmón	Espuito, Orina	<i>S. pneumoniae</i> (§)	20	Sí	18	Sí
# 11	52	F	AA	Hemocultivo	<i>E. coli</i>	20	Sí	18	Sí
# 30	56	M	TUS	Hemocultivo, Orina	<i>E. coli</i>	21	Sí	17	Sí
# 14	51	F	AA	Hemocultivo	<i>P. mirabilis</i>	16	Sí	16	No
# 8	80	F	Pulmón	Espuito, Orina	<i>S. pneumoniae</i> (§)	15	Sí	12	No
# 19	58	F	AA	Hemocultivo	<i>E. coli</i>	20	Sí	15	Sí
# 12	80	F	Pulmón	Hemocultivo, Orina	<i>E. coli</i>	19	Sí	15	Sí
62,4 $\pm$ 12,6						17,8 $\pm$ 2,3***		14,27 $\pm$ 0,9**	

*E. coli*, *Escherichia coli*; *P. mirabilis*, *Proteus mirabilis*; *S. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*. (§) = Detección en orina del antígeno de *S. pneumoniae*. APACHE II = Sistema de puntuación de gravedad de la enfermedad. TUS = Tracto Urinario Superior. AA = Absceso Abdominal. Los valores de la fila inferior de cada tercil representan la media  $\pm$  EEM; \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 tras comparar con el Primer tercil.

#### **1.4 Los niveles de expresión de $\alpha 7$ ARNm en CMSP de pacientes sépticos se correlacionan directamente el grado de actividad vagal.**

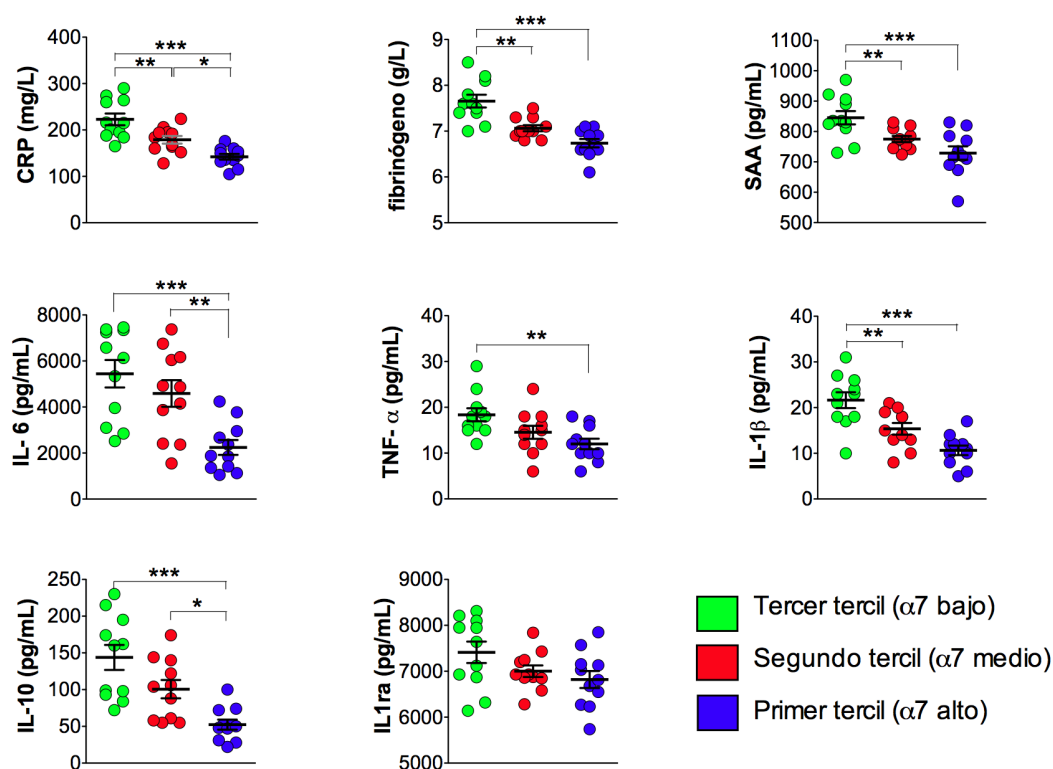
El grado de actividad vagal en los pacientes sépticos fue determinado a partir de la medida de diversos índices de HRV, tal como se ha comentado en la correspondiente sección de Materiales y Métodos. Nuestros resultados en los pacientes distribuidos por terciles muestran que los dos índices que mejor reflejan la actividad vagal en el corazón (RMSSD y nHF) fueron significativamente más elevados en los pacientes del primer tercil que en los del tercer tercil (Figs. 16A y 16B); esto también ocurría con sus niveles de expresión de  $\alpha 7$  ARNm (Fig. 15B). Esta coincidencia sugiere la existencia de una relación directa entre los niveles de expresión de  $\alpha 7$  en CMSP y la actividad vagal cardíaca en pacientes sépticos, lo cual pudo ser confirmado. Así, los valores de RMSSD y nHF, determinados en 25 de los 33 pacientes sépticos a la inclusión en el estudio, se correlacionaban directamente con sus niveles de  $\alpha 7$  ARNm ( $\rho = 0,66$  y  $0,73$ ; respectivamente), siendo ambas correlaciones fuertemente significativas ( $p < 0,001$ ). También se puede observar que tanto el componente LF, como la relación LF/HF, en los pacientes del tercer tercil fueron significativamente más bajos que los del primer tercil (Figs. 16C y 16D). Los anteriores resultados indican que los pacientes con un mayor nivel de expresión de  $\alpha 7$  ARNm (primer tercil) tienen una mayor actividad vagal.



**Figura 16. Actividad vagal determinada a través de varios índices de HRV en pacientes sépticos distribuidos por terciles.** Esta distribución se realizó de acuerdo a su nivel de expresión de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP. RMSSD = raíz cuadrada del valor medio de las diferencias al cuadrado de todos los intervalos R-R sucesivos; nHF = parámetro espectral de alta frecuencia normalizado; nLF = parámetro espectral de baja frecuencia normalizado; LF/HF = cociente de ambos componentes espectrales indicativo del balance vago/simpático. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  tras comparar los terciles indicados. Figura modificada de (Cedillo y col., 2015).

### 1.5 Diferencias en la expresión de $\alpha 7$ ARNm y del tono vagal cardiaco influyen el estado inflamatorio de los pacientes sépticos.

La Figura 17 muestra las concentraciones séricas de citoquinas (pro- y anti-inflamatorias) y proteínas reactantes de fase aguda en los pacientes agrupados por terciles. Los pacientes del primer tercil (con alta expresión de  $\alpha 7$  ARNm) poseen niveles de proteína C reactiva (CRP), fibrinógeno, proteína amiloide sérica (SAA), interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleuquina 10 (IL-10) significativamente inferiores a los detectados en pacientes del tercer tercil (baja expresión de  $\alpha 7$  ARNm).



**Figura 17. Estado inflamatorio de los pacientes sépticos agrupados por terciles de acuerdo a su nivel de expresión de  $\alpha 7$  ARNm.** Los datos, representados en diagramas de puntos, reflejan la concentración sérica o plasmática de las proteínas reactantes de fase aguda y de las citoquinas pro- y anti-inflamatorias en cada paciente. \*p<0,05; \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 comparando los terciles indicados. CRP, Proteína C Reactiva; SAA, Proteína amiloide sérica; TNF- $\alpha$ , Factor de necrosis tumoral alfa, IL-6, Interleuquina 6; IL-1 $\beta$ , Interleuquina 1-beta; IL-10, Interleuquina 10; IL-1ra, antagonista del receptor de la interleuquina 1. Figura modificada de (Cedillo y col., 2015).

Se encontró una correlación inversa significativa entre los niveles de  $\alpha 7$  ARNm y la mayoría de los marcadores inflamatorios determinados en el conjunto de pacientes: para CRP, rho = - 0,71 (p<0,001); para fibrinógeno, rho = - 0,76 (p<0,001); para SAA,

$\rho = -0,65$  ( $p < 0,001$ ); para IL-6,  $\rho = -0,67$  ( $p < 0,001$ ); para TNF- $\alpha$ ,  $\rho = -0,46$  ( $p < 0,01$ ); para IL-1 $\beta$ ,  $\rho = -0,73$  ( $p < 0,001$ ) y para IL-10,  $\rho = -0,76$  ( $p < 0,001$ ). También se observó una correlación inversa significativa entre los índices de control vagal cardíaco, RMSSD y nHF, y la mayoría de los marcadores inflamatorios: para CRP,  $r = -0,53$  ( $p < 0,01$ ) y  $-0,45$  ( $p < 0,05$ ), respectivamente; fibrinógeno,  $r = -0,52$  ( $p < 0,01$ ) y  $-0,44$  ( $p < 0,05$ ), respectivamente; SAA,  $r = -0,57$  ( $p < 0,01$ ) y  $-0,58$  ( $p < 0,01$ ), respectivamente; IL-6,  $r = -0,55$  ( $p < 0,01$ ) y  $-0,53$  ( $p < 0,01$ ), respectivamente; IL-1 $\beta$ ,  $r = -0,57$  ( $p < 0,01$ ) y  $-0,42$  ( $p < 0,05$ ), respectivamente; e IL-10,  $r = -0,61$  ( $p < 0,01$ ) y  $-0,53$  ( $p < 0,01$ ), respectivamente.

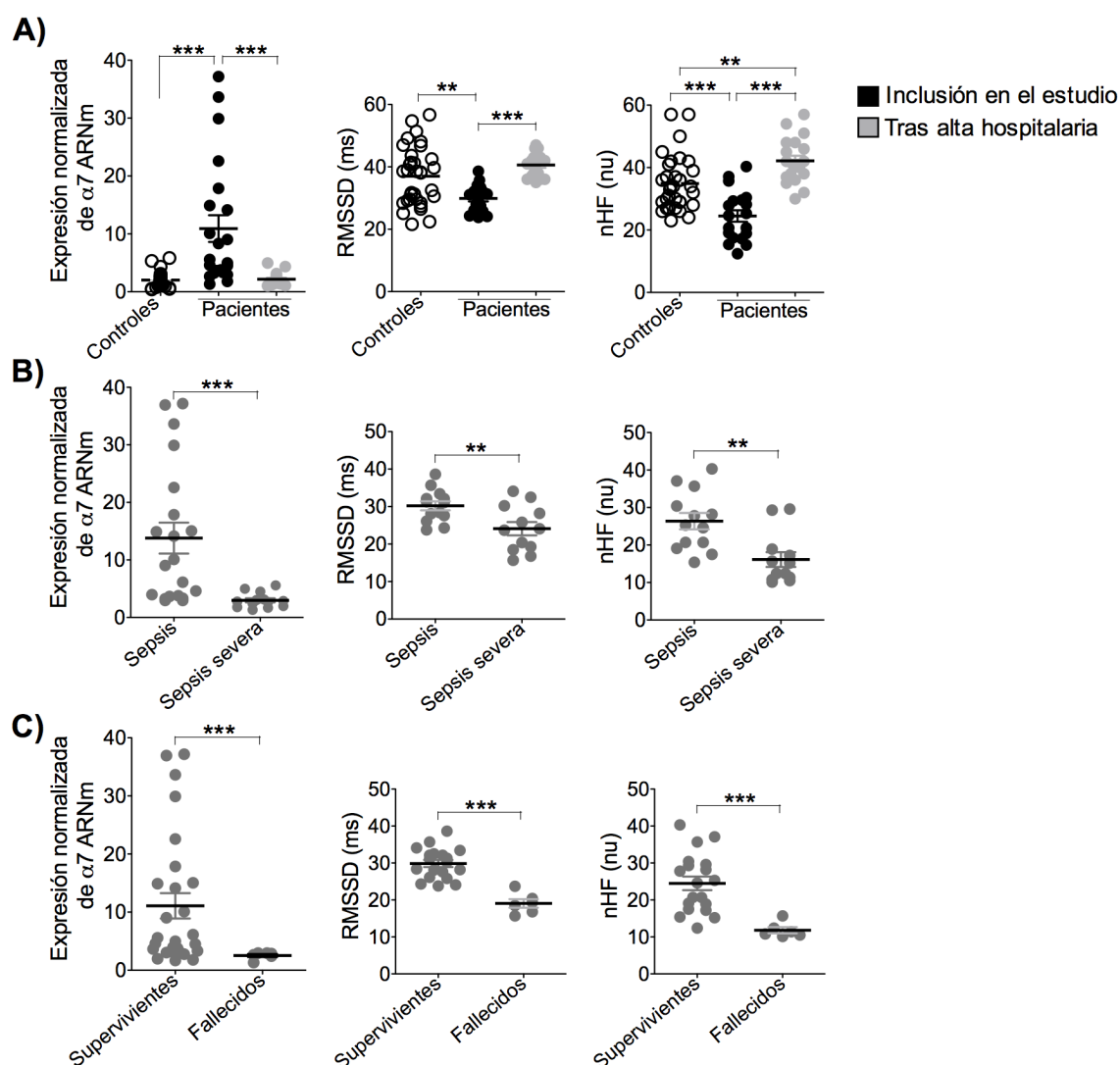
### **1.6 Regulación dinámica de la actividad de la vía colinérgica antiinflamatoria (CAP) en pacientes sépticos y su relación con la severidad y la evolución clínica.**

Para evaluar si el agravamiento o la resolución de la sepsis afectaba a la actividad de la CAP, deducida a partir de los niveles de expresión del  $\alpha 7$  ARNm en CMSP y de los índices de control vagal cardíaco, se volvieron a determinar todos estos valores en los pacientes supervivientes 15 días después de su alta hospitalaria.

Los resultados obtenidos mostraban que la actividad colinérgica antiinflamatoria respondía dinámicamente al estado inflamatorio de los pacientes (Fig. 18A, panel izquierdo). Así, los niveles de  $\alpha 7$  ARNm fueron altos durante el proceso agudo de la enfermedad y bajaron al nivel del grupo control (sujetos sanos) una vez que el paciente se recuperaba. Los niveles de  $\alpha 7$  ARNm de los pacientes trasladados a la UCI por desarrollar sepsis severa fueron significativamente menores que los de los pacientes que permanecieron estables (Fig. 18B, panel izquierdo). La expresión de  $\alpha 7$  ARNm de los pacientes que sobrevivieron fue significativamente más alta que la de los que fallecieron ( $p < 0,001$ ) (Fig. 18C, panel izquierdo).

Por su parte, los valores de RMSSD y nHF fueron significativamente inferiores a los del grupo control (sujetos sanos) durante el proceso séptico, acercándose a valores similares a los controles tras la resolución de la enfermedad (Fig. 18A, paneles central y derecho). Estos últimos datos concuerdan con lo obtenido en estudios previos que encuentran una disminución en los índices de HRV en endotoxemia experimental humana (Godin y col., 1996) y sepsis (Annane y col., 1999; Korach y col., 2001). Sin

embargo, independientemente de los niveles de expresión del  $\alpha 7$  ARNm o del tono cardíaco vagal durante la sepsis, nuestros resultados claramente demuestran que mientras mayor sea la actividad de la vía colinérgica antiinflamatoria en los pacientes, mejor es su estado clínico y su pronóstico. De hecho, los niveles de expresión de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP y los valores RMSSD y nHF se correlacionaban inversamente con el índice de severidad APACHE II [ $\rho = -0,73$  ( $p < 0,001$ );  $-0,68$  ( $p < 0,001$ ) y  $-0,71$  ( $p < 0,001$ ), respectivamente], a la vez que se asociaban inversamente con la severidad de la enfermedad (Fig. 18B) y la mortalidad (Fig. 18C).



**Figura 18. Regulación de la vía colinérgica antiinflamatoria (CAP) en pacientes sépticos y su relación con la severidad y evolución clínica de la enfermedad.** La actividad de esta vía fue determinada de dos maneras: por los niveles de expresión de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP e, indirectamente, por los índices de actividad cardíaca vagal. A) La actividad de la CAP es regulada dinámicamente durante la fase aguda de la enfermedad, retornando a valores controles después de la resolución de la misma. B y C) Los pacientes con mayor actividad colinérgica antiinflamatoria muestran mejor evolución y mejor pronóstico. \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ , tras comparar los grupos indicados. Figura modificada de (Cedillo y col., 2015).

Para evaluar la posible utilidad, como predictor de mortalidad, de los niveles de expresión de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP de pacientes sépticos utilizamos un valor de corte de expresión de 3. Este último era el valor más alto de los obtenidos en el tercer tercil (rango, 1,32–3,0), tercil que incluye a todos los pacientes fallecidos del estudio (Tabla 4). No hubo muertes entre los pacientes con valores superiores a 3, pertenecientes al primer tercil (rango 9,0–31,7) y segundo tercil (rango, 3,1–6,1). Mientras, en el grupo con niveles de  $\alpha 7$  ARNm inferiores a 3 (tercer tercil), el 60% de los pacientes fallecieron ( $p < 0,001$ ). En consecuencia, el 85,2% de los supervivientes (95% intervalo de confianza, 70,7%–99,7%) tenían niveles de  $\alpha 7$  ARNm superiores a 3, y todos los pacientes fallecidos tuvieron niveles inferiores a 3.

### **1.7 Expresión del dup $\alpha 7$ ARNm en pacientes sépticos y su correlación con la expresión de $\alpha 7$ ARNm y con el estado inflamatorio y la severidad de la enfermedad.**

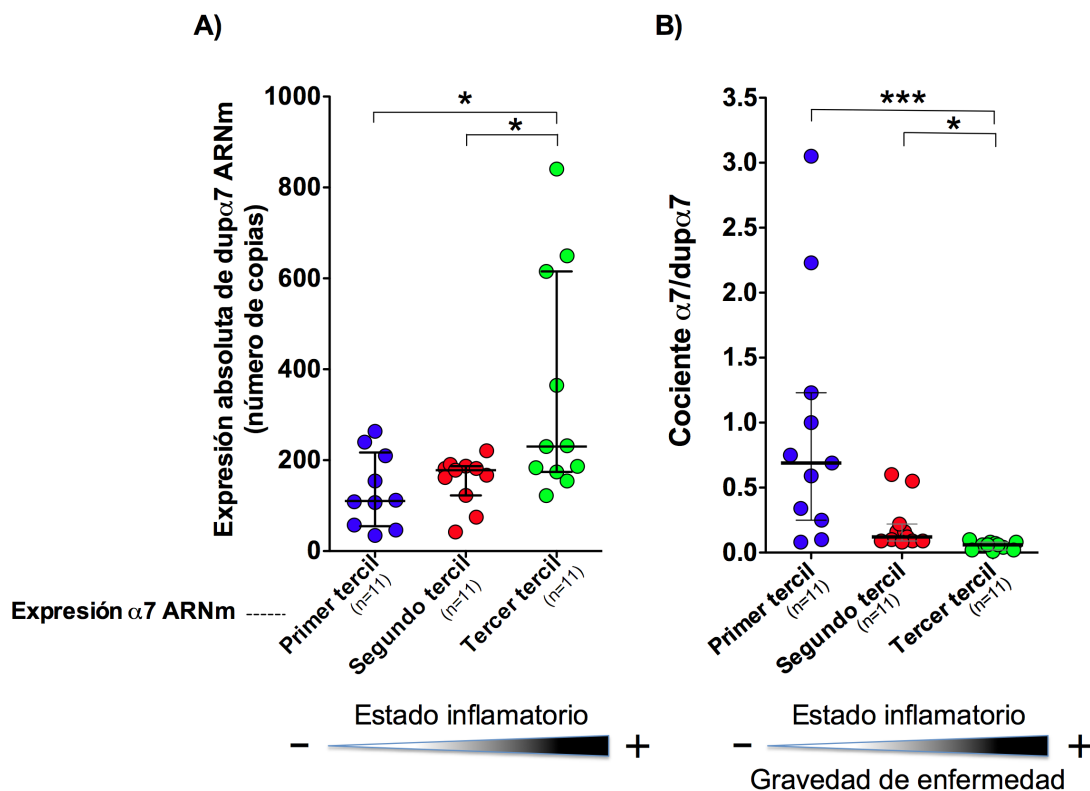
Tal como se ha mostrado en la sección de Introducción de esta Tesis, resultados *in vitro* realizados previamente por nuestro grupo habían demostrado que dup $\alpha 7$  se comportaba como un modulador negativo del efecto antiinflamatorio mediado por el  $\alpha 7$  nAChR en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 estimulada con LPS (Maldifassi 2014). Sin embargo, hasta el inicio del presente estudio, había permanecido sin explorar si dup $\alpha 7$  desempeñaba algún papel en procesos patológicos humanos que cursan con excesiva respuesta inflamatoria, como sería el caso de la sepsis. Por otra parte, en el estudio piloto llevado a cabo por nuestro grupo en pacientes sépticos, habíamos llegado a establecer que la expresión normalizada del  $\alpha 7$  ARNm, determinada por qPCR en CMSP de estos pacientes, puede ser un buen marcador de la actividad de la vía colinérgica antiinflamatoria (Cedillo y col., 2015) y, por tanto, del estado inflamatorio y evolución de la enfermedad.

En base a los anteriores hallazgos, en el presente estudio hemos analizado si dup $\alpha 7$  tendría la capacidad de interactuar con el  $\alpha 7$  nAChR en el control de la inflamación en sepsis humana. Para contestar esta pregunta, y poder analizar la correlación entre los mensajeros de dup $\alpha 7$  y  $\alpha 7$ , procedimos a determinar los valores de expresión absoluta de ambos mensajeros, lo que se llevó a cabo determinando el número de copias de cada ARNm en CMSP de los 33 pacientes sépticos incluidos en el

estudio piloto anterior. La determinación de la expresión absoluta de cada ARNm se realizó por qPCR, tal como se detalla en la correspondiente sección de Materiales y Métodos. Como era esperable, los valores absolutos de expresión de  $\alpha 7$  mostraban una gran variabilidad entre pacientes, al igual que ocurría con los valores de la expresión normalizada. Por ello, los pacientes se distribuyeron, nuevamente, por terciles de acuerdo a los referidos niveles absolutos de expresión de  $\alpha 7$  ARNm. Así, los valores de expresión media de este último mensajero  $\pm$  EEM, obtenidos en 4 determinaciones independientes realizadas por triplicado, fueron de  $112,2 \pm 34,18$  copias,  $24,76 \pm 4,52$  copias y  $13,77 \pm 1,36$  copias para los terciles primero, segundo y tercero, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre el primer y tercer tercil en relación a los anteriores valores de expresión.

La Figura 19 muestra un diagrama de puntos reflejando el número de copias del  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm (panel A) y el cociente entre el número de copias de los mensajeros de  $\alpha 7$  y de  $\text{dup}\alpha 7$  (panel B) en los pacientes distribuidos por terciles, tal como se ha descrito anteriormente. El valor de expresión de  $\text{dup}\alpha 7$  correspondiente a la mediana fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) en los pacientes del tercer tercil (bajos niveles de  $\alpha 7$  ARNm) que en pacientes de los otros dos terciles (Fig. 19A). La Figura 19B muestra diferencias significativas entre los terciles en lo que respecta al cociente  $\alpha 7/\text{dup}\alpha 7$ . Así, la mediana del cociente fue significativamente inferior en pacientes del tercer tercil (bajos niveles de  $\alpha 7$  y altos niveles de  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm) que en los otros dos terciles. Existe una correlación inversa y significativa ( $\rho = -0,3984$ ;  $p < 0,05$ ) entre los niveles de expresión de  $\text{dup}\alpha 7$  y los de  $\alpha 7$  en el conjunto de pacientes sépticos. Finalmente, encontramos una correlación directa significativa entre los niveles de  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm y las concentraciones séricas de algunos marcadores inflamatorios determinados en el conjunto de pacientes: para  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\rho = 0,46$  ( $p < 0,01$ );  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\rho = 0,37$  ( $p < 0,05$ ); CRP,  $\rho = 0,39$  ( $p < 0,05$ ). En contraste, se observó una correlación inversa significativa entre el cociente  $\alpha 7/\text{dup}\alpha 7$  y las concentraciones séricas de los anteriores marcadores inflamatorios o la severidad de la enfermedad: para  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\rho = -0,41$  ( $p < 0,05$ );  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\rho = -0,60$  ( $p < 0,001$ ); CRP,  $\rho = -0,61$  ( $p < 0,001$ ); APACHE II,  $\rho = -0,69$  ( $p = 0,001$ ).



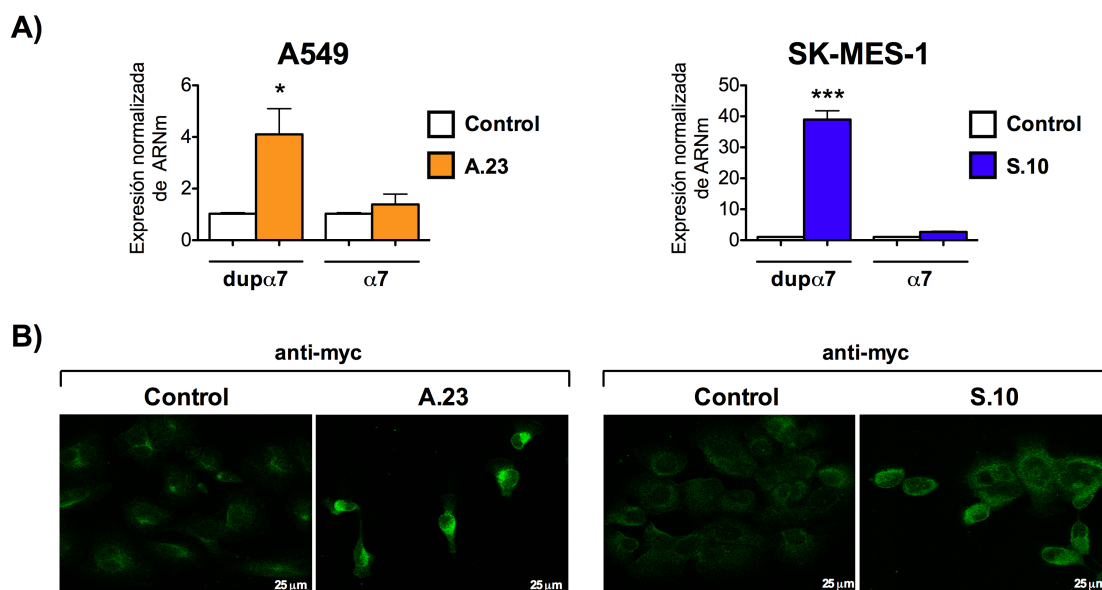


**Figura 19. Análisis de la expresión de dupα7 ARNm y cociente α7/dupα7 en pacientes sépticos.** Diagrama de puntos mostrando los niveles de expresión absoluta de dupα7 ARNm (A) y el cociente entre la expresión absoluta de los mensajeros de α7 y dupα7 (B) determinados por qPCR en CMSP de 33 pacientes sépticos. Los pacientes fueron distribuidos por terciles de acuerdo a sus niveles de expresión absoluta de α7 ARNm (Primer tercil = expresión alta; Segundo tercil = expresión media; Tercer tercil = expresión baja). Cada valor, obtenido por triplicado, representa la media de 3-4 determinaciones independientes. Las barras horizontales y verticales muestran la mediana y el rango intercuartil del grupo, respectivamente. Los datos fueron analizados con el test de ANOVA (A) y el test de Kruskal-Wallis seguido del test post-hoc de Dunn (B). \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  después de comparar los terciles indicados. Las barras degradadas en la parte inferior de la figura reflejan la existencia de correlación significativa entre los niveles de expresión de dupα7 o el cociente α7/dupα7 y el estado inflamatorio o la severidad de la enfermedad.

## **2. RESULTADOS *IN VITRO*, *IN VIVO* Y CLÍNICOS EN CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS (NSCLC).**

### **2.1 Preparación de colonias con sobreexpresión estable de dup $\alpha$ 7.**

Se seleccionaron dos líneas celulares humanas representativas de los dos principales tipos histológicos de NSCLC, adenocarcinoma (A549) y carcinoma de células escamosas (SK-MES-1). Ambas líneas expresan endógenamente el  $\alpha$ 7 nAChR. Con el fin de analizar si dup $\alpha$ 7 ejercía un efecto modulador negativo sobre este último subtipo de receptor, se procedió a la transfección de ambas líneas celulares con el plásmido pcDNA3.1-myc-dup $\alpha$ 7-His con objeto de proceder, posteriormente, a la selección de colonias con sobreexpresión estable de dup $\alpha$ 7. De las 3 colonias seleccionadas por línea celular, se escogió finalmente una colonia de cada línea cuyos niveles de expresión de  $\alpha$ 7 ARNm no difirieran significativamente de los encontrados en células de la misma estirpe no sometidas a transfección (control). El procedimiento de transfección y selección de las colonias de interés se detalla en la correspondiente sección de Materiales y Métodos. La Figura 20 muestra los resultados de qPCR e inmunocitoquímica de las dos colonias con sobreexpresión estable de dup $\alpha$ 7 seleccionadas en este estudio: colonia A.23 (correspondiente a la línea celular A549) y colonia S.10 (correspondiente a la línea celular SK-MES-1). En la parte superior de la figura (panel A) se muestran los niveles de los mensajeros de dup $\alpha$ 7 y  $\alpha$ 7 determinados por qPCR en las células controles y las de las colonias transfectadas; se observa un aumento significativo de expresión del dup $\alpha$ 7 ARNm en ambas colonias respecto a la expresión detectada en las células controles de la misma estirpe. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre la colonia transfectada y no transfectada en relación con los niveles de expresión de  $\alpha$ 7 ARNm en ninguno de los dos tipos celulares evaluados. Los resultados de inmunocitoquímica de la Figura 20B corroboran los datos del dup $\alpha$ 7 ARNm, pero a nivel de la proteína. Así, las imágenes confocales de las colonias A.23 y S.10, marcadas con el anticuerpo anti-myc, constatan el aumento de expresión de la subunidad dup $\alpha$ 7 respecto al encontrado en las células controles.



**Figura 20.** Células de las colonias con sobreexpresión estable de *dupα7* seleccionadas en este estudio. Las colonias A.23 y S.10 corresponden a las líneas celulares de adenocarcinoma (A549) y de carcinoma de células escamosas (SK-MES-1) de pulmón humano, respectivamente. A) Niveles de expresión de los mensajeros de *dupα7* y *α7* determinados por qPCR en las colonias y en células no transfectadas de cada estirpe (control). B) Imágenes confocales mostrando la expresión de la subunidad *dupα7*-myc en las colonias y en células controles; la subunidad fue marcada con el anticuerpo anti-myc. Los datos son representativos de 3-4 experimentos realizados en 2 cultivos distintos. \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  comparando los niveles de expresión frente a las células no transfectadas.

## 2.2 Experimentos *in vitro*: *dupα7* interfiere con diversos procesos tumorogénicos mediados por el *α7* nAChR en líneas celulares de NSCLC.

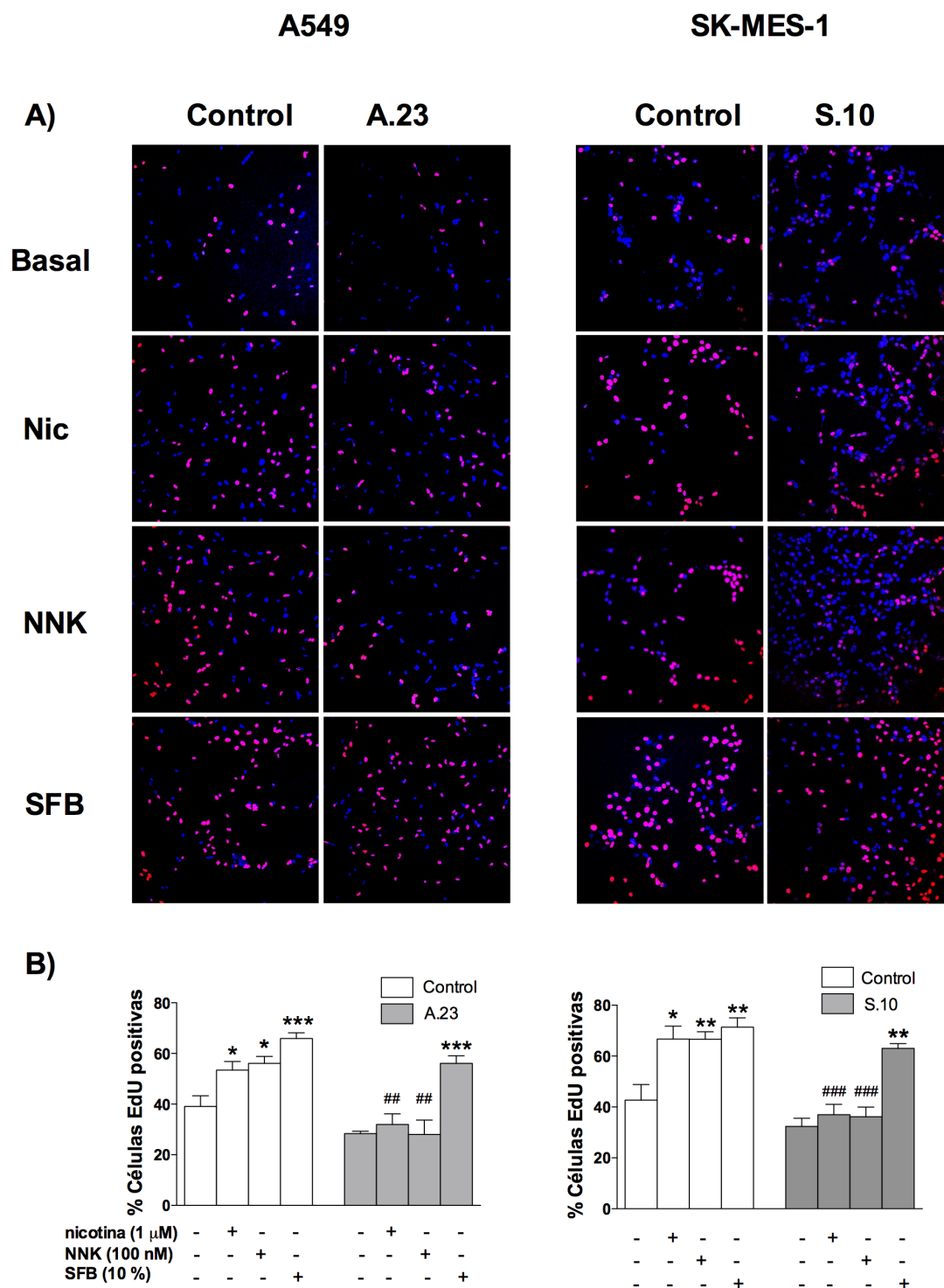
Estos experimentos se realizaron en las líneas celulares tumorales A549 y SK-MES-1 mencionadas anteriormente, tanto controles como con sobreexpresión estable de *dupα7* (A.23 y S.10). El propósito de los mismos fue evaluar si dicha sobreexpresión interfería con el efecto tumorogénico mediado por el *α7* nAChR a nivel de la proliferación, migración y transición epitelio/mesenquimal. A continuación se describen los resultados de este grupo de experimentos.

### 2.2.1 La sobreexpresión de dup $\alpha$ 7 inhibe la capacidad proliferativa celular mediada por el $\alpha$ 7 nAChR.

Células A549 y SK-MES-1, controles o con sobreexpresión estable de dup $\alpha$ 7, fueron estimuladas durante 24 h con 1  $\mu$ M nicotina o 100 nM NNK para inducir la proliferación. Como control positivo de proliferación se utilizó un grupo de células estimuladas en paralelo con 10% de SFB. La visualización al microscopio confocal de las células que proliferan se realizó con el compuesto EdU (análogo del nucleósido timidina) marcado con la sonda fluorescente AlexaFluor 647 (rojo). Solo las células que proliferan incorporan este compuesto durante la síntesis de nuevo ADN y, por tanto, serán marcadas por la sonda. Mientras tanto, los núcleos de todas las células, tanto de las que proliferan como de las que no lo hacen, fueron marcados con DAPI (azul).

La Figura 21A muestra imágenes confocales representativas de la proliferación inducida por los diferentes estímulos en ambas líneas celulares. A la derecha de cada línea celular aparece la proliferación en las células A.23 y S.10; a la izquierda la proliferación en las células control de cada estirpe celular. Se observa como el marcaje con EdU en células controles aumenta en respuesta a nicotina o NNK frente a células no estimuladas (basal). Ambos estímulos inducen una menor proliferación en células A.23 y S.10.

La Figura 21B muestra la media  $\pm$  EEM de la proliferación inducida por los distintos estímulos en 3 experimentos independientes realizados en cada línea celular, tal como se acaba de describir. Se observa como nicotina, NNK o SFB aumentan significativamente el porcentaje de células A549 y SK-MES-1 que proliferan respecto a las células no estimuladas (basal). Sin embargo, las colonias A.23 y S.10 solo responden significativamente a la proliferación inducida por SFB, pero no a la promovida por nicotina o NNK. Estos resultados indican que las células A549 y SK-MES-1 con sobreexpresión estable de dup $\alpha$ 7 mantienen intacto su potencial proliferativo, aunque pierden su capacidad para responder a los estímulos proliferativos de nicotina o NNK.



**Figura 21.** Efecto de la sobreexpresión de *dupa7* sobre la proliferación mediada por el  $\alpha 7$  nAChR en células A549 y SK-MES-1. Células con sobreexpresión estable de *dupa7* (A.23 y S.10) y sus correspondientes controles (no transfectadas) fueron estimuladas con nicotina o NNK; se utilizó suero fetal bovino (SFB), al 10%, como estímulo positivo de la proliferación. A) Imágenes confocales (20X) representativas de las células que proliferan (marcadas de rojo por el EdU) y del total de células del campo (cuyos núcleos aparecen marcados de azul por el DAPI). Las células que proliferan están doblemente marcadas (magenta). B) Valores medios  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes mostrando el porcentaje de células que proliferan en respuesta a los distintos estímulos. \*p<0,05 y \*\*\*p<0,001 comparando la proliferación en células estimuladas con la obtenida en células no estimuladas del mismo tipo (basal); ##p<0,01 y ###p<0,001 comparando A.23 o S.10 con sus respectivos controles sometidos al mismo estímulo.

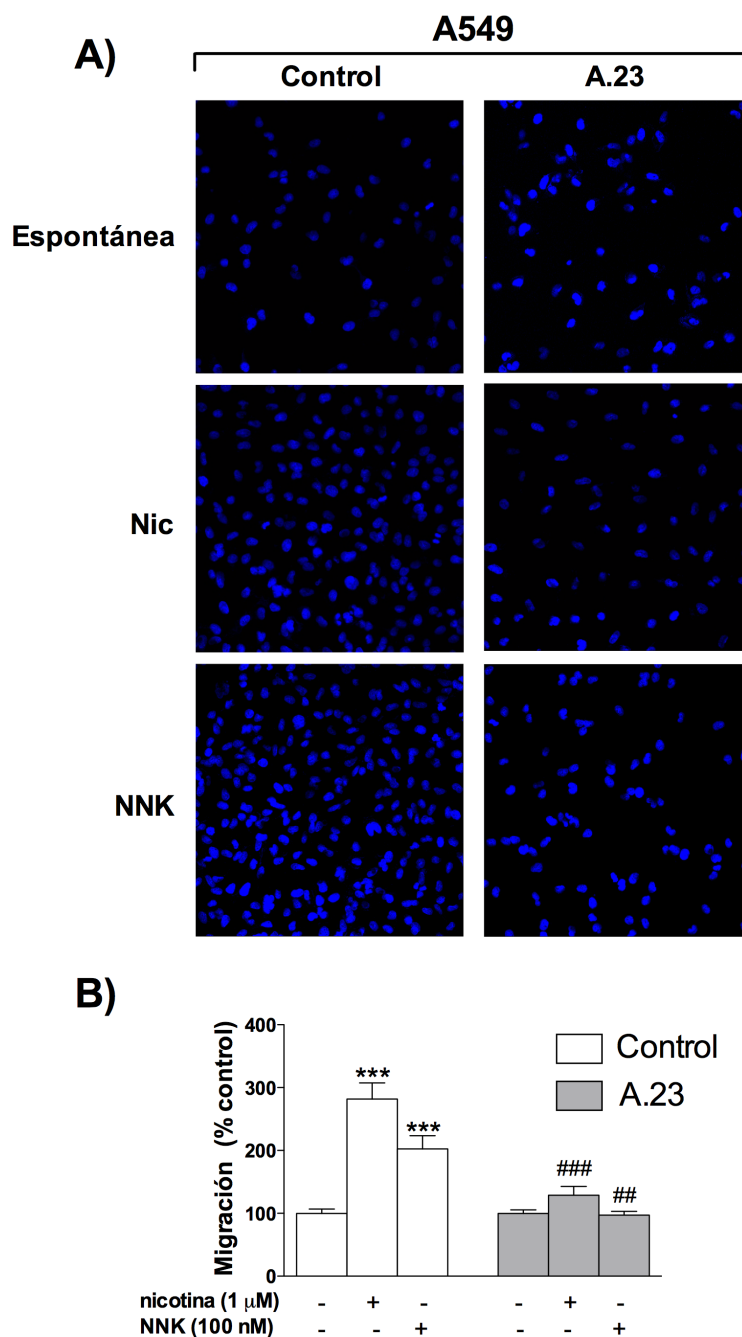
### 2.2.2 La sobreexpresión de dup $\alpha$ 7 frena la capacidad migratoria celular mediada por el $\alpha$ 7 nAChR.

Para analizar la capacidad migratoria en células A549 y SK-MES-1, tanto controles como con sobreexpresión estable de dup $\alpha$ 7 (A.23 y S.10), se realizaron dos tipos de ensayos: el “*Ensayo de Migración por Transwell*” y el “*Ensayo de Cierre de la Herida*”, cuyos resultados se exponen a continuación.

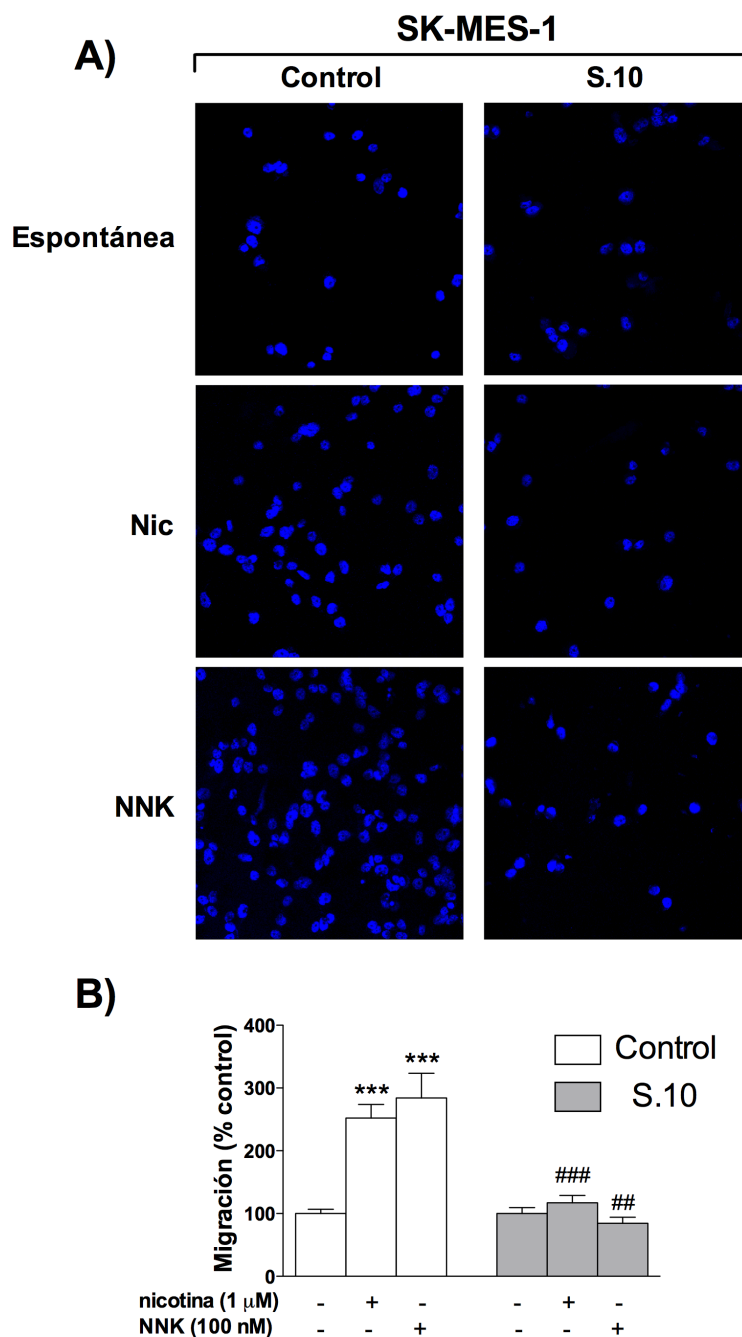
#### ***a) Ensayo de Migración por Transwell.***

Las células fueron estimuladas 24 h con 1  $\mu$ M de nicotina o 100 nM de NNK para inducir la migración celular. La medida de la migración a través de este ensayo ya ha sido detallada en la correspondiente sección de Materiales y Métodos. Las Figuras 22 y 23 muestran los resultados de la migración inducida por cada estímulo en células A549 y SK-MES-1, respectivamente. Los paneles A de ambas figuras muestran imágenes confocales representativas del aumento de migración inducida por nicotina y NNK en células controles de ambos tipos en relación con la migración espontánea observada en células no estimuladas. El incremento de la migración inducida por ambos estímulos no se produce en células de las colonias A.23 y S.10.

La Figura 22B muestra los valores medios  $\pm$  EEM de la migración inducida por nicotina o NNK en 3-4 experimentos independientes realizados en células A549, como se acaba de describir. La migración en células controles fue incrementada significativamente por nicotina ( $\sim 3$  veces;  $p < 0,001$ ) y por NNK ( $\sim 2$  veces;  $p < 0,001$ ) respecto a la obtenida en las mismas células no estimuladas (espontánea). También se observó un incremento significativo de la migración inducida por ambos estímulos ( $\sim 3$  veces;  $p < 0,001$ ) en células SK-MES-1 controles respecto a células no estimuladas en 3 experimentos realizados de forma independiente (Fig. 23B). Por el contrario, la estimulación con nicotina o NNK no modificó la migración espontánea de las colonias de A.23 y S.10 (Figs. 22B y 23B).



**Figura 22. “Ensayo de Migración por Transwell” evaluando el efecto de la sobreexpresión de  $\text{dup}\alpha 7$  sobre la migración mediada por el  $\alpha 7$  nAChR en células A549.** Células controles o con sobreexpresión estable de  $\text{dup}\alpha 7$  (A.23) fueron estimuladas durante 24 h con nicotina o NNK para inducir la migración. A) Imágenes confocales (40X) representativas de la migración inducida por nicotina; las células que migraban a través de la membrana y quedaban retenidas en ella eran identificadas por su núcleo marcado por el DAPI (azul). B) Valores medios  $\pm$  EEM de 3-4 experimentos independientes mostrando la migración obtenida en células controles (izquierda) o en células A.23 (derecha) para cada condición experimental; los valores de migración aparecen expresados como porcentaje de los obtenidos en células no estimuladas del mismo grupo (migración espontánea). \*\*\* $p < 0,001$  comparando células estimuladas y no estimuladas controles. ## $p < 0,01$  y ### $p < 0,001$  comparando células A.23 con células controles sometidas al mismo estímulo.



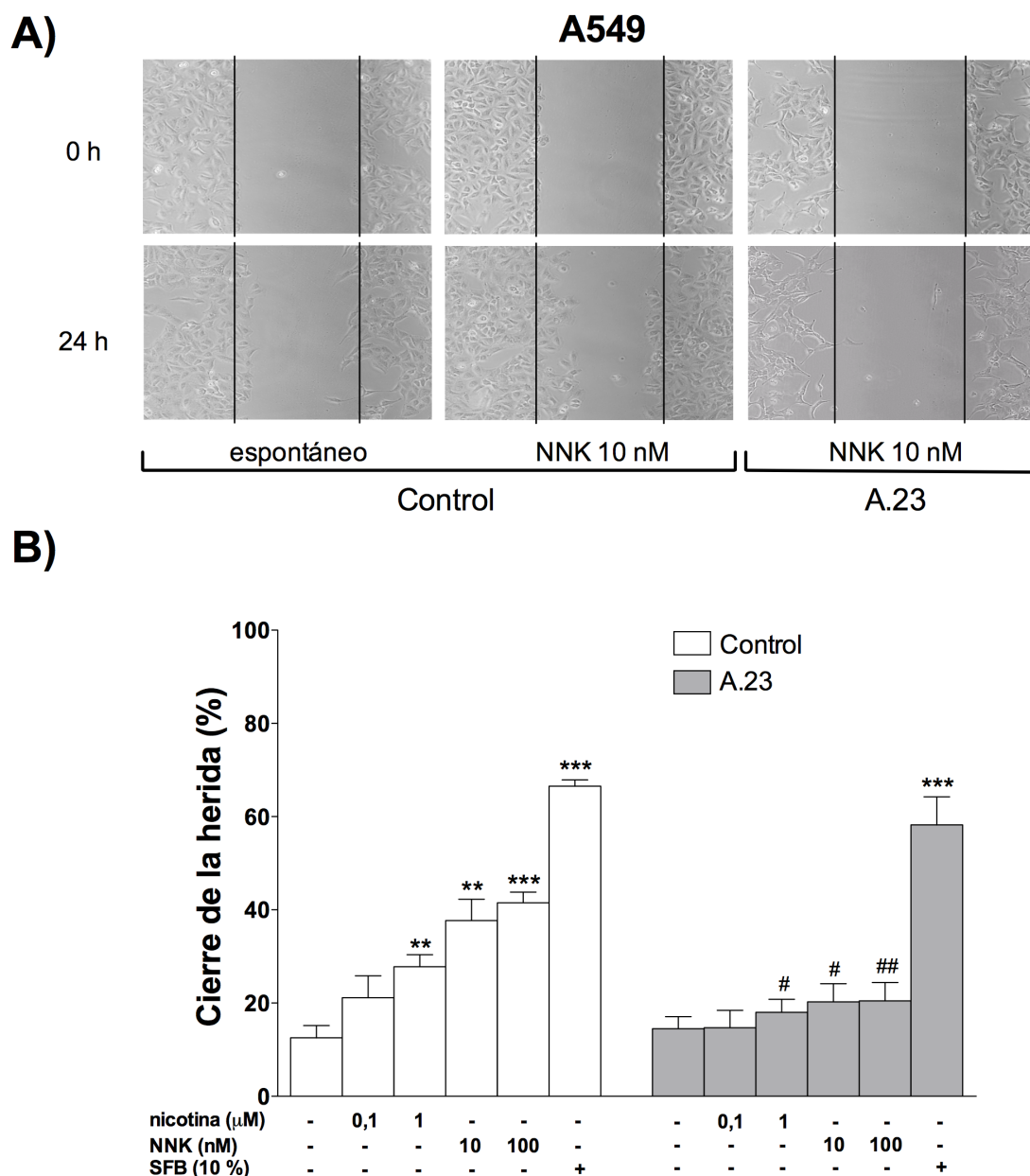
**Figura 23. “Ensayo de Migración por Transwell” evaluando el efecto de la sobreexpresión de  $\text{dup}\alpha 7$  sobre la migración mediada por el  $\alpha 7$  nAChR en células SK-MES-1.** Células controles o con sobreexpresión estable de  $\text{dup}\alpha 7$  (S.10) fueron estimuladas durante 24 h con nicotina o NNK para inducir la migración. A) Imágenes confocales (40X) representativas de la migración inducida por nicotina; las células que migraban a través de la membrana y quedaban retenidas en ella eran identificadas por su núcleo marcado por el DAPI (azul). B) Valores medios  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes mostrando la migración obtenida en células controles (izquierda) o en células S.10 (derecha) para cada condición experimental; los valores de migración aparecen expresados como porcentaje de los obtenidos en células no estimuladas del mismo grupo (migración espontánea). \*\*\* $p < 0,001$  comparando células estimuladas y no estimuladas controles. ## $p < 0,01$  y ### $p < 0,001$  comparando células S.10 con células controles sometidas al mismo estímulo.



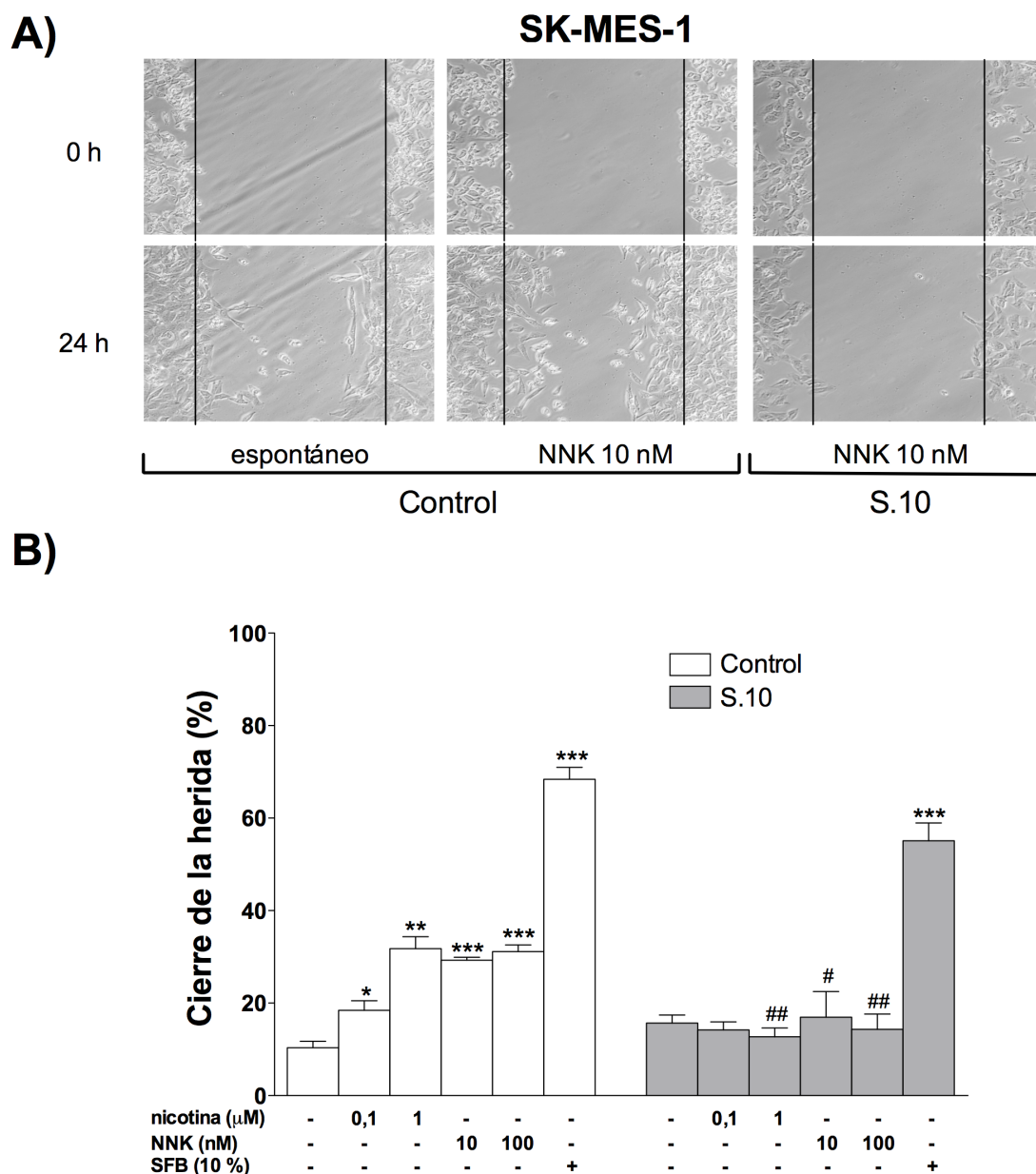
***b) Ensayo de Migración por Cierre de la Herida.***

Un segundo tipo de ensayo, cuyo protocolo se detalla en la correspondiente sección de Materiales y Métodos, fue aplicado a la hora de analizar el efecto de la sobreexpresión de dup $\alpha$ 7 sobre la capacidad migratoria de células A549 y SK-MES-1. Las Figuras 24 y 25 muestran los resultados de este ensayo analizando la migración inducida por 24h de estimulación con nicotina (0,1 y 1  $\mu$ M) o NNK (10 y 100 nM) en ambos tipos celulares. Los paneles A de ambas figuras muestran imágenes representativas de la herida en campo claro, obtenidas por microscopía óptica, en células A549 y SK-MES-1 controles o con sobreexpresión estable de dup $\alpha$ 7 (A.23 y S.10, respectivamente). Las imágenes fueron captadas antes de aplicar un estímulo de NNK (tiempo 0 h) o al finalizar la exposición al mismo (tiempo 24 h). A pesar de la baja concentración de NNK utilizada, a las 24 h de aplicación del estímulo ya es posible detectar el cierre parcial de la herida en células controles frente a células no estimuladas de ambas estirpes. Por el contrario, NNK no fue capaz de inducir el cierre de la herida en células A.23 y S.10.

Las Figuras 24B y 25B muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cierre de la herida obtenidos en experimentos independientes (n =4) realizados en células A549 o SK-MES-1, como se acaba de describir. Los valores representan el porcentaje de herida cerrada a las 24 h de aplicación del estímulo respecto a la apertura de la herida registrada en el tiempo 0h (100 %). Se utilizó un lote de células no estimuladas de cada grupo para establecer el cierre espontáneo de la herida a las 24 h; este último valor fue  $12,57 \pm 2,59$  % (para A549 control),  $14,52 \pm 2,57$  % (para A.23);  $10,83 \pm 1,39$  % (para SK-MES-1 control) y  $15,69 \pm 1,71$  % (para S.10). La Figura 24B muestra que nicotina (1  $\mu$ M) y NNK (a las dos concentraciones utilizadas) inducen un aumento significativo de migración en células A549 controles pero no en aquellas de la colonia A.23. Lo mismo se observa con las células SK-MES-1 controles y las de la colonia S.10 (Fig. 25B). A pesar de la falta de respuesta de las células A.23 y S.10 a nicotina o NNK en lo que concierne a la activación de la migración, la capacidad migratoria de ambas colonias permanece intacta como se constata utilizando un estímulo ajeno al  $\alpha$ 7 nAChR para inducir la migración, como es el SFB (al 10 %).



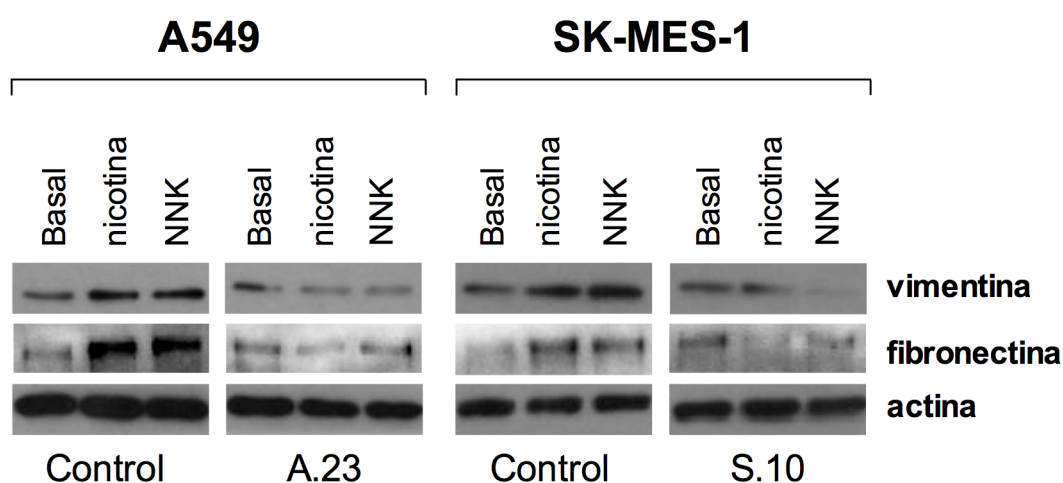
**Figura 24. “Ensayo de Cierre de la Herida” evaluando el efecto de la sobreexpresión de *dupa7* sobre la migración mediada por el  $\alpha 7$  nAChR en células A549.** Células controles o con sobreexpresión estable de *dupa7* (A.23) fueron estimuladas durante 24 h con diferentes concentraciones de nicotina o NNK para inducir la migración. A) Imágenes representativas de microscopía óptica en campo claro (10X) visualizando la apertura de la herida en células controles o células A.23 antes (tiempo 0) o después del tratamiento con NNK (tiempo 24 h). Células de ambos grupos no estimuladas, pero sometidas a idénticas manipulaciones, fueron utilizadas para registrar el cierre espontáneo de la herida a las 24 h. B) Valores medios  $\pm$  EEM (n = 4) mostrando el cierre de la herida en células controles (izquierda) o en células A.23 (derecha) para cada condición experimental; los valores representan el porcentaje de herida cerrada a las 24 h de aplicar el estímulo con respecto a la apertura de la herida en el tiempo 0 (100%). \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 comparando células estimuladas y no estimuladas del mismo grupo. #p<0,05 y ##p<0,01 comparando células A.23 con células controles sometidas al mismo estímulo. Como control positivo para inducir el cierre de la herida en los dos grupos de células se utilizó SFB, al 10%.



**Figura 25. “Ensayo de Cierre de la Herida” evaluando el efecto de la sobreexpresión de *dupa7* sobre la migración mediada por el  $\alpha 7$  nAChR en células SK-MES-1.** Células controles o con sobreexpresión estable de *dupa7* (S.10) fueron estimuladas durante 24 h con diferentes concentraciones de nicotina o NNK para inducir la migración. A) Imágenes representativas de microscopía óptica en campo claro (10X) visualizando la apertura de la herida en células controles o células S.10 antes (tiempo 0) o después del tratamiento con NNK (tiempo 24 h). Células de ambos grupos no estimuladas, pero sometidas a idénticas manipulaciones, fueron utilizadas para registrar el cierre espontáneo de la herida a las 24 h. B) Valores medios  $\pm$  EEM (n = 4) mostrando el cierre de la herida en células controles (izquierda) o en células S.10 (derecha) para cada condición experimental; los valores representan el porcentaje de herida cerrada a las 24 h de aplicar el estímulo con respecto a la apertura de la herida en el tiempo 0 (100%). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  comparando células estimuladas y no estimuladas del mismo grupo. # $p < 0,05$  y ## $p < 0,01$  comparando células S.10 con células controles sometidas al mismo estímulo. SFB, al 10%, fue utilizado como control positivo para inducir el cierre de la herida en los dos grupos de células.

### 2.2.3 La sobreexpresión del dupa7 bloquea la transición epitelio-mesenquimal mediada por el $\alpha 7$ nAChR.

La transición de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal se asocia a metástasis tumoral y es también un indicador de progresión tumoral. Por ello, esta transición fue también evaluada en nuestro estudio registrando los cambios de expresión de marcadores mesenquimales (vimentina y fibronectina) en células A549 y SK-MES-1 controles o con sobreexpresión estable de dupa7 (A.23 y S.10) tras ser estimuladas con nicotina o NNK durante 48 h. La Figura 26 muestra un inmunoblot típico reflejando los cambios de expresión de los anteriores marcadores mesenquimales en los distintos grupos celulares en respuesta a nicotina (1  $\mu$ M) o NNK (100 nM). La expresión basal de ambos marcadores fue determinada en células no estimuladas pertenecientes a cada uno de los 4 grupos celulares objeto de estudio. Los resultados muestran que la estimulación de las células controles de ambas estirpes con nicotina y NNK induce un incremento de expresión de vimentina y fibronectina en relación con la observada en células no estimuladas. Dicho incremento no se produce en células A.23 y S.10, lo cual indica que la sobreexpresión de dupa7 frena la transición epitelio/mesenquimal mediada por el  $\alpha 7$ -nAChR en ambos tipos histológicos de NSCLC.

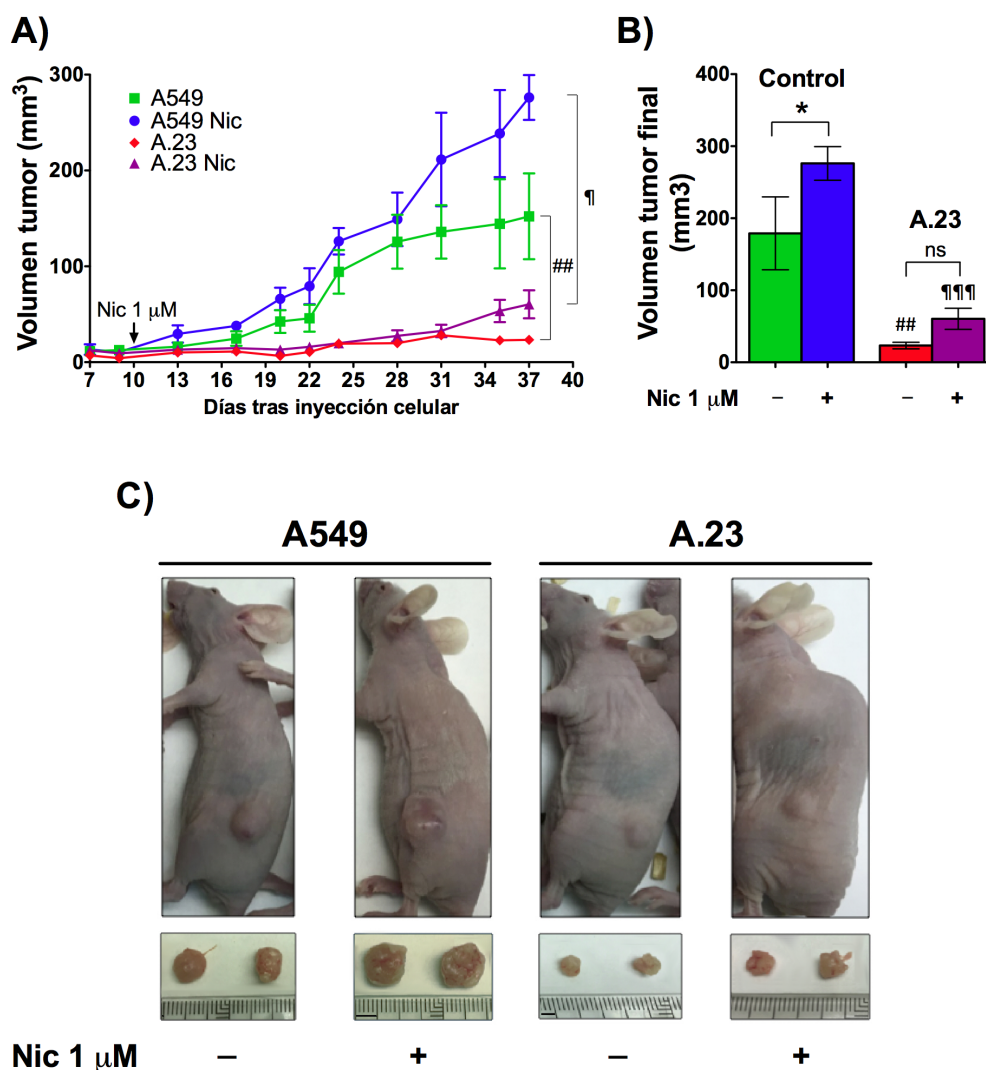


**Figura 26.** Inmunoblot típico mostrando el efecto de la sobreexpresión del dupa7 sobre la transición epitelio-mesenquimal mediada por el  $\alpha 7$  nAChR en células A549 y SK-MES-1. Células controles de ambos tipos histológicos, así como células con sobreexpresión estable de dupa7 (A.23 y S.10), fueron estimuladas con nicotina o NNK para inducir la transición epitelio-mesenquimal, la cual fue evaluada a través de la expresión de los marcadores mesenquimales vimentina y fibronectina. Células no estimuladas de cada uno de los cuatro grupos reflejaban la expresión basal de ambos marcadores.

### 2.3 Experimentos *in vivo*: la sobreexpresión de dup $\alpha$ 7 frena el desarrollo tumoral en ratones atímicos inyectados con células A549.

Los resultados *in vitro* mostrados hasta ahora indican que la sobreexpresión de dup $\alpha$ 7 frena diversos procesos relacionados con la progresión tumoral inducida por nicotina y NNK en líneas celulares de NSCLC. Para evaluar si los resultados *in vitro* pueden ser reproducidos *in vivo*, se diseñaron los siguientes experimentos. Se utilizaron 22 ratones atímicos desnudos distribuidos en 4 grupos (n = 5-6 ratones/grupo). Tras inyectar la suspensión celular en el flanco izquierdo (A549 en dos grupos y A.23 a otros dos grupos), los animales inyectados con cada tipo histológico celular se separaron en dos grupos independientes, según recibieran o no nicotina. La nicotina se administró en el agua de bebida, a la concentración de 1  $\mu$ M, desde el día 10<sup>o</sup> post-inyección hasta la finalización del estudio y sacrificio del animal.

La Figura 27A muestra la progresión media del volumen del tumor  $\pm$  EEM en cada uno de los grupos de ratones. A partir del día 10 post-inyección, y a lo largo de los 37 días de duración del estudio, se observa un crecimiento progresivo del tumor en los dos grupos inyectados con la suspensión celular de A549, tanto si recibían como si no recibían nicotina. Aunque el grupo de ratones inyectados con A549 que recibió nicotina mostró volúmenes tumorales superiores a los del grupo que no la recibió a lo largo de todo el periodo analizado, las diferencias de volúmenes entre ambos grupos no llegaron a alcanzar valores significativos. La Figura 27A también muestra como el crecimiento tumoral no se produce en ninguno de los grupos de ratones inyectados con la suspensión celular de A.23, independientemente que hubieran recibido nicotina o no. El crecimiento tumoral en los 4 grupos a lo largo de todo el experimento mostró diferencias significativas entre los ratones inyectados con A.23 y los inyectados con A549 sometidos al mismo protocolo experimental. La Figura 27B muestra los valores medios  $\pm$  EEM del volumen del tumor alcanzado al finalizar el experimento, tras la extracción del tumor del animal. Se observan diferencias significativas de volumen entre los animales inyectados con A549 que recibieron nicotina frente a los que no la recibieron. Estas diferencias son mucho más acusadas cuando se comparan los volúmenes tumorales de los animales inyectados con A.23 respecto a los inyectados con A549 en las mismas condiciones experimentales. La Figura 27C muestra imágenes de un ratón prototipo de cada grupo, así como del correspondiente tumor tras su extirpación al finalizar el estudio.

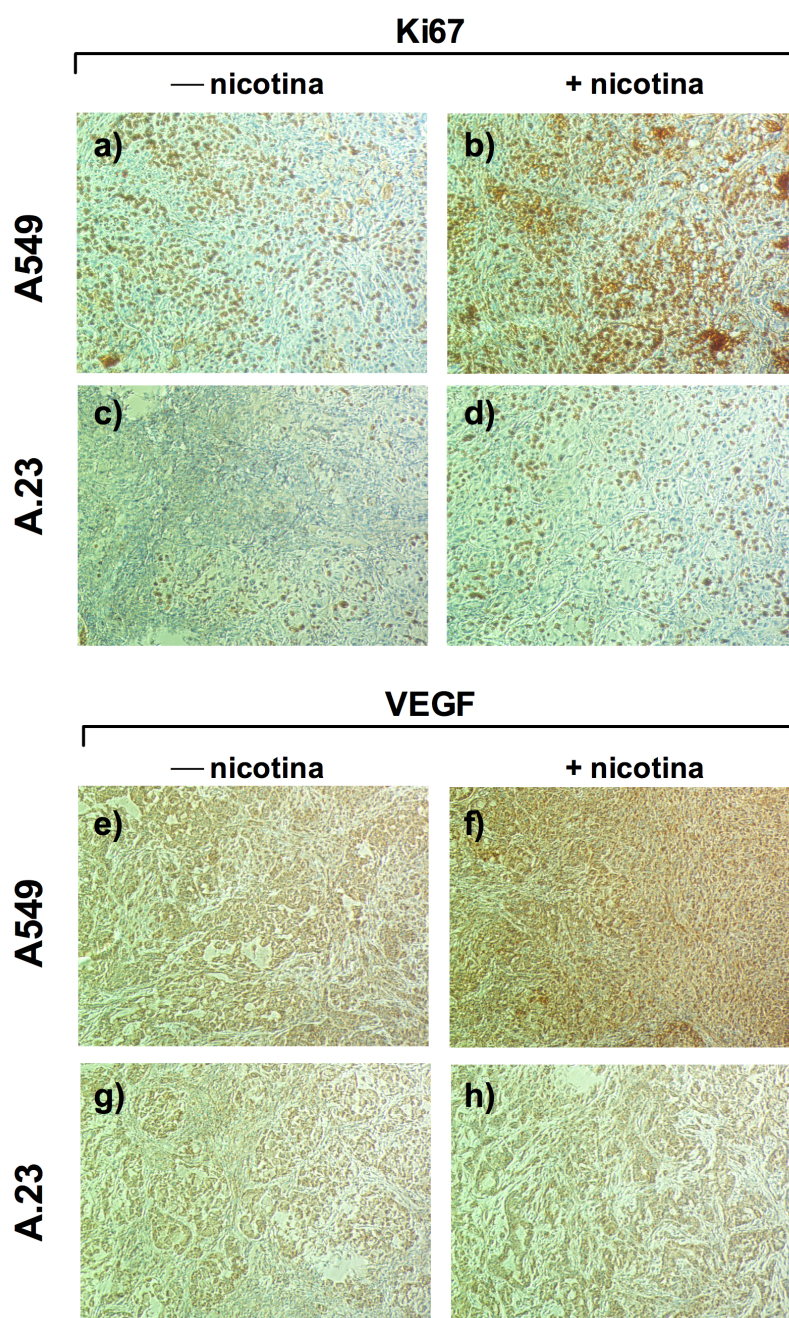


**Figura 27.** La sobreexpresión de *dupa7* interfiere con el crecimiento tumoral de células A549 inyectadas en ratones atímicos desnudos. Los ratones se distribuyeron en 4 grupos (5-6 ratones/grupo), según se les inyectara en su flanco izquierdo una suspensión celular de A549 (2 grupos) o de A.23 (2 grupos). De los dos grupos inyectados con el mismo tipo celular, solo uno de ellos recibió nicotina en el agua de bebida. A) Evolución del volumen tumoral medio  $\pm$  EEM determinado a lo largo del estudio en los cuatro grupos de ratones. B) Valor medio  $\pm$  EEM del volumen del tumor extraído al finalizar del estudio en cada grupo. C) Imágenes de un ratón prototipo de cada grupo, y de su correspondiente tumor, tras el sacrificio del animal. <sup>†</sup> $p < 0,05$  y <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$  comparando células A.23 frente a las células control sometidas al mismo estímulo; <sup>##</sup> $p < 0,01$  comparando las células A.23 frente a células control sin estímulo; \* $p < 0,05$  comparando el volumen tumoral de las células control tratadas con nicotina frente a las mismas células sin tratamiento.

Al finalizar el estudio, secciones de 3,5  $\mu\text{m}$  correspondientes a piezas tumorales extraídas de 2 ratones de cada uno de los anteriores grupos fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios y secundarios para identificar, por inmunohistoquímica, los marcadores de proliferación (Ki67) o de angiogénesis (VEGF). La Figura 28 muestra imágenes de microscopía óptica representativas de cortes tumorales pertenecientes a cada grupo en donde se puede identificar los dos marcadores anteriores; el marcaje de Ki67 se produce fundamentalmente en el núcleo, mientras que el de VEGF es citoplasmático. Se observa un aumento muy pronunciado de expresión de Ki67 en los tumores A549 de los animales que recibieron nicotina frente a los que no la recibieron (b *vs.* a). El aumento de expresión de Ki67 inducido por nicotina es prácticamente inexistente en los tumores A.23 (d *vs.* c). Se constata también una expresión de Ki67 muy inferior en los tumores A.23 frente a los A549, tanto en el caso de ratones no expuestos a nicotina (c *vs.* a) como de los que si la recibieron (d *vs.* b).

En relación a la expresión de VEGF, se aprecia un aumento de la misma en tumores A549 expuestos a nicotina frente a los no expuestos a este agente (f *vs.* e). Por el contrario, la administración de nicotina apenas modifica la expresión del marcador de angiogénesis en tumores A.23 (h *vs.* g). Se observa un marcaje de VEGF ligeramente superior en tumores A549 frente a los A.23 en ratones no expuestos a nicotina (g *vs.* e); estas diferencias de marcaje entre tumores A549 y los A.23 son mucho más pronunciadas en el caso de los ratones que recibieron nicotina (h *vs.* f).





**Figura 28. La sobreexpresión de *dupa7* frena la proliferación y angiogénesis inducida por nicotina en tumores de ratones atímicos desnudos inyectados con células A549 o A.23.** Imágenes (10X) de secciones tumorales mostrando la detección inmunohistoquímica del marcador de proliferación (Ki67) y de angiogénesis (VEGF) utilizando anticuerpos específicos. Las imágenes para cada marcador son representativas de cada uno de los 4 grupos de ratones utilizados en el estudio y corresponden a los tumores generados en los ratones inyectados con las suspensiones celulares de A549 (a-b, e-f) o A.23 (c-d, g-h), según recibieran o no nicotina en el agua de bebida.



## 2.4 Resultados Clínicos.

### 2.4.1 Características demográficas y clínicas de los pacientes con NSCLC incluidos en el estudio.

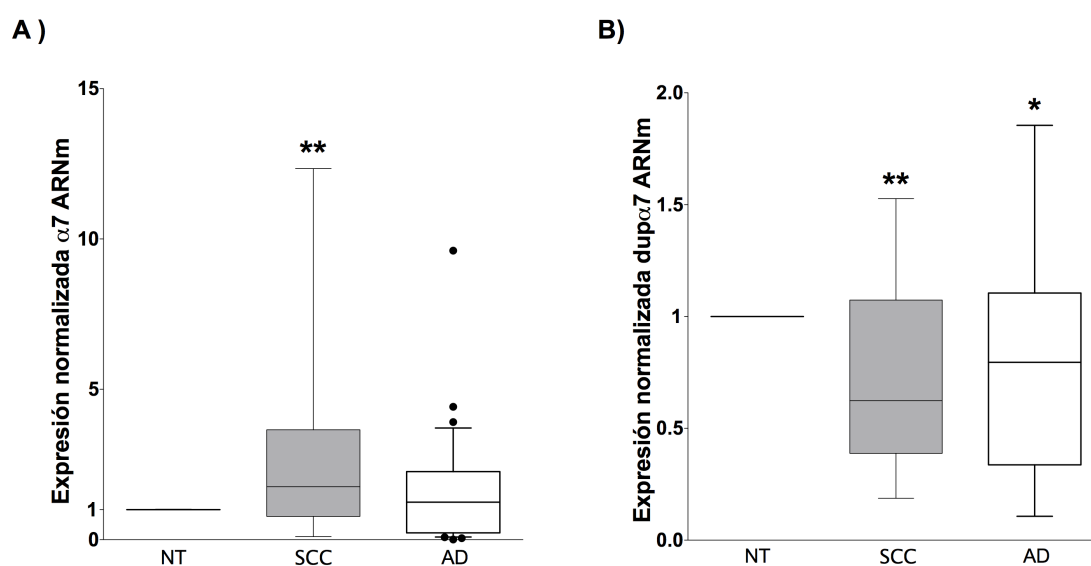
Biopsias pulmonares pareadas, tumorales y no tumorales, pertenecientes a 78 pacientes diagnosticados de NSCLC fueron analizadas en este estudio. Las características demográficas y clínicas de los pacientes se recogen en la Tabla 5. Los pacientes se agruparon de acuerdo al tipo histológico tumoral [40 (51,3%) con carcinoma de células escamosas (SCC), y 38 (48,7%) con adenocarcinoma (AD)], al sexo y edad. La mayoría de los pacientes con SCC (87,5%) eran fumadores activos al momento del diagnóstico, con un historial de consumo de tabaco superior a las 20 cajetillas anuales. Mientras tanto, más de la mitad de los pacientes con AD (55,3%) eran no fumadores o fumadores pasivos. El grado de diferenciación tumoral, realizado de acuerdo a la clasificación consenso sobre cáncer de pulmón del año 2015 (Travis y col., 2015), así como el desenlace final de la enfermedad, se recogen en la Tabla 5.

**Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes cuyas biopsias pulmonares fueron utilizadas en el estudio.**

<b>Tipo histológico</b>	<b>SCC</b>	<b>AD</b>
<b>Número de biopsias tumorales</b>	40 (51,3%)	38 (48,7%)
<b>Sexo</b>		
Masculino	32 (80%)	25 (65,8%)
Femenino	8 (20%)	13 (34,2%)
<b>Edad</b>		
< 60 años	5 (12,5%)	3 (7,9%)
> 60 años	35 (87,5%)	35 (92,1%)
<b>Hábito tabáquico</b>		
No fumadores	3 (7,5%)	11 (29,0%)
Fumadores pasivos	2 (5,0%)	10 (26,3%)
Fumadores activos	35 (87,5%)	17 (44%)
<b>Grado de diferenciación</b>		
Bien/moderada	22 (55%)	18 (47,4%)
Pobre	18 (45%)	20 (52,6%)
<b>Desenlace clínico</b>		
Supervivencia libre de enfermedad (mediana)	47 meses	54 meses
Tasa de supervivencia a los 5 años (%)	60,0	68,4

### 2.4.2 Niveles de expresión de los mensajeros $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$ determinados en biopsias pulmonares de los pacientes con NSCLC.

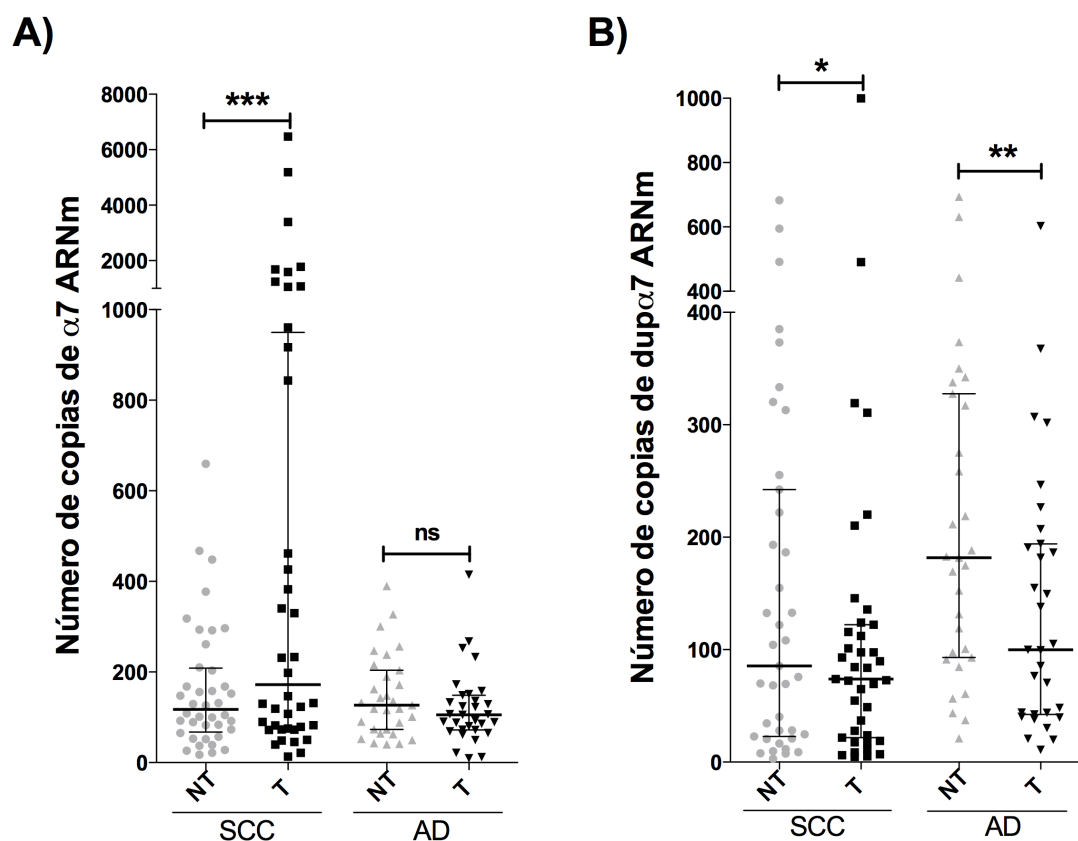
El nivel de expresión de los mensajeros  $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$  fue analizado por qPCR en las biopsias pulmonares pareadas, tumorales y no tumorales, de los pacientes con NSCLC incluidos en el estudio. La Figura 29 muestra, mediante un diagrama de caja-bigotes, la expresión normalizada de ambos mensajeros en las muestras tumorales de los pacientes respecto a sus correspondientes muestras pareadas no tumorales; los tumores aparecen agrupados, según el tipo histológico, en SCC o AD. Los resultados revelan un incremento significativo de expresión de  $\alpha 7$  ARNm en tumores SCC respecto a las muestras no tumorales; dicho incremento no se detecta en tumores de AD (Fig. 29A). Por el contrario, se observa una reducción significativa de la expresión de  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm en ambos tipos tumorales con respecto a sus correspondientes muestras pareadas no tumorales (Fig. 29B).



**Figura 29. Expresión normalizada de los mensajeros de  $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$  en biopsias pulmonares de pacientes con NSCLC.** Las biopsias correspondían a 78 pacientes [40 con carcinoma de células escamosas (SCC) y 38 con adenocarcinoma (AD)]. Muestras pareadas no tumorales (NT) de todos los pacientes fueron utilizadas para la normalización de la expresión en la muestra tumoral. Las barras horizontales muestran la mediana y los rangos intercuartiles. \* $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  respecto a la muestra pareada no tumoral. Figura modificada de (Bordas y col., 2017).

Los anteriores resultados relativos a la expresión normalizada de  $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$  en los dos tipos histológicos tumorales de NSCLC fueron posteriormente corroborados por los datos de expresión absoluta de ambos mensajeros (número de copias del ARNm)

determinados en las biopsias pareadas tumorales y no tumorales de pulmón de los mismos pacientes (Fig. 30). Los resultados revelan que, comparando con los especímenes no tumorales, solo los tumores SCC muestran un incremento significativo de expresión de  $\alpha 7$  ARNm (Fig. 30A). Mientras tanto, ambos tipos de tumores comparten una reducción significativa en el número de copias de  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm.



**Figura 30.** Expresión absoluta de los mensajeros de  $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$  en muestras pulmonares tumorales y no tumorales de pacientes con carcinoma de células escamosas (SCC) o adenocarcinoma (AD) de pulmón. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  tras comparar las muestras tumorales (T) con sus correspondientes muestras pareadas no tumorales (NT) en cada tipo histológico tumoral; ns = no significativo. Figura modificada de (Bordas y col., 2017).

# Discusión

# 1. RELEVANCIA DE LA VÍA COLINÉRGICA ANTIINFLAMATORIA EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN EN SEPSIS HUMANA: LA EXPRESIÓN DE $\alpha 7$ ARNm EN CMSP COMO MARCADOR DE LA ACTIVIDAD DE ESTA VÍA.

Nuestro estudio representa la primera evidencia experimental, obtenida en pacientes sépticos y no en modelos animales de sepsis, en donde se demuestra la importancia de la vía colinérgica antiinflamatoria (CAP) a la hora de restringir el exceso de respuesta inflamatoria. Nuestros datos también muestran que la actividad de este mecanismo antiinflamatorio, en un paciente séptico concreto, puede ser deducida a partir de los niveles de expresión del  $\alpha 7$  ARNm determinado en sus CMSP por técnicas de qPCR. Finalmente, también demostramos que los niveles de expresión de  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm en las mismas células se correlacionan inversamente con los de  $\alpha 7$  ARNm y con el estado inflamatorio del paciente, abriendo la posibilidad de que ambas subunidades nicotínicas puedan participar, de forma antagónica, en el control de la inflamación en sepsis.

La determinación del nivel de expresión del  $\alpha 7$  ARNm en CMSP de pacientes sépticos fue seleccionada como indicador de la actividad de la CAP en base a las siguientes observaciones previas: 1º) el  $\alpha 7$  nAChR es el receptor principal que interviene en este mecanismo antiinflamatorio (Wang y col., 2004; Pavlov y col., 2007; Parrish y col., 2008b; Vida y col., 2011; Zhao y col., 2012; Olofsson y col., 2012); 2º) el  $\alpha 7$  ARNm es expresado en muchos tipos de células productoras de citoquinas (de Jonge y Ulloa, 2007); y 3º) la cuantificación del ARNm en CMSP es fácilmente realizable y requiere un procedimiento mínimamente invasivo. La dificultad metodológica que entraña la determinación de los niveles de  $\alpha 7$  ARNm por técnicas de qPCR reside en que, junto a este transcrito, se puede amplificar el transcrito correspondiente a  $\text{dup}\alpha 7$ , el cual nosotros (y otros) hemos encontrado que posee una actividad reguladora negativa sobre la actividad del  $\alpha 7$  nAChR *in vitro* (de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Araud y col., 2011). La secuencia nucleotídica de los mensajeros de  $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$  son altamente homólogas (>99%) y ambos transcritos presentan un patrón de distribución similar en cerebro y células inmunes (Gault y col., 1998; de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Araud y col., 2011; Benfante y col., 2011; Costantini y col., 2015; Kunii y col., 2015). Por tanto, si no se diseñan cebadores específicos para cada ARNm, se pueden amplificar por qPCR ambos transcritos dando lugar a datos de expresión de  $\alpha 7$  ARN erróneos, tal

como ya ha sucedido en estudios previos (Villiger y col., 2002; Hecker y col., 2015; Reale y col., 2015; Conti y col., 2016). Nosotros hemos sorteado esta dificultad diseñando una pareja de cebadores que amplifica la región divergente del N-terminal (exones 3-4 del *CHRNA7*) de la subunidad  $\alpha 7$ , así como una segunda pareja que amplifica desde el exón A al exón 5 del *CHRFAM7A* que codifica para la subunidad  $\text{dup}\alpha 7$ .

Tres de nuestros hallazgos relativos a los niveles de expresión de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP de los pacientes sépticos merecen ser destacados: 1º) estos niveles fueron significativamente más altos en la mayoría de los pacientes sépticos (terciles primero y segundo) que en controles (Fig. 15B); 2º) dichos niveles respondían dinámicamente al estado inflamatorio de los pacientes [Figs. 17; Fig. 18A (panel izquierdo)]; y 3º) existía un subgrupo de pacientes (tercer tercil), con bajo nivel de expresión de  $\alpha 7$  ARNm, que tuvo una respuesta antiinflamatoria ineficiente frente a la infección y, consecuentemente, un peor pronóstico [Figs. 17; Figs. 18B y 18C (panel izquierdo)]. Todos los anteriores hallazgos relacionados con el nivel de expresión de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP son perfectamente compatibles con el comportamiento de un biomarcador típico.

El hallazgo de que el control vagal de la HRV refleja, indirectamente, la capacidad de respuesta de la CAP en un modelo humano de endotoxemia (Marsland y col., 2007) concuerda con datos clínicos que muestran como una disminución de la actividad vagal cardíaca, medida a través de los índices de RMSSD y nHF, es un signo precoz de empeoramiento y mortalidad en pacientes sépticos (Schmidt y col., 2005). Adicionalmente, la activación farmacológica de la CAP en endotoxemia humana se ha asociado con un incremento de la actividad vagal cardíaca, medida a través de los cambios en la HRV (Pavlov y col., 2006). Ya que nuestros resultados muestran que los niveles de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP están directamente correlacionados con los valores de RMSSD y nHF en pacientes sépticos, sospechamos que dichos niveles podrían ser un buen marcador de la actividad de la CAP en sepsis. Consecuentemente, la regulación positiva de la expresión del  $\alpha 7$  ARNm podría incrementar la capacidad antiinflamatoria de la ACh liberada endógenamente tras la estimulación de la anterior vía.

Aunque la relación causal entre los niveles de expresión de  $\alpha 7$  ARNm y la actividad de la CAP necesita ser confirmada en estudios longitudinales con mayor número de pacientes y mayor potencia estadística, existen numerosos hallazgos experimentales en la literatura a favor de dicha relación. Así, la sobreexpresión de  $\alpha 7$

ARNm inducida por nicotina en monocitos THP-1 conduce a un aumento de la capacidad antiinflamatoria de los agonistas del  $\alpha 7$  nAChR, medida por la reducción de los niveles de TNF- $\alpha$  (van der Zanden y col., 2012). También ha sido descrito que los macrófagos deficientes en  $\alpha 7$  nAChRs son refractarios al efecto antiinflamatorio de los agonistas del receptor, mientras que los ratones knockout para  $\alpha 7$  son mas susceptibles a la inflamación sistémica y endotoxemia letal que los ratones controles (Wang y col., 2003; Wang y col., 2004).

Los datos de nuestro estudio también refuerzan, de forma inequívoca, la utilidad de la medida de los niveles de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP como marcador de la actividad de la CAP. Así, hemos encontrado una correlación inversa significativa entre los anteriores niveles y las concentraciones séricas de todas las citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) y las proteínas reactantes de fase aguda. La correlación inversa entre los niveles de  $\alpha 7$  ARNm (que refleja la actividad de la vía colinérgica antiinflamatoria) y la citoquina antiinflamatoria IL-10 parece algo sorprendente, pero podría explicarse por los hallazgos de un estudio previo que muestran como la infusión de IL-6 humana recombinante para inducir un grado de inflamación bajo-moderado en jóvenes voluntarios sanos produce un incremento de las concentraciones plasmáticas de dos citoquinas anti-inflamatorias, IL-10 e IL-1ra (Steensberg y col., 2003). Aunque no hay una evidencia real de que esto también esté ocurriendo en nuestros pacientes sépticos, es altamente probable que sea así dado que los niveles séricos de IL-6 de nuestros pacientes son significativamente más altos que los encontrados en los voluntarios sanos infundidos con esta citoquina en el estudio anterior. Así, es probable que los altos niveles séricos de IL-10 en nuestros pacientes con baja actividad de la CAP pudieran deberse a la alta concentración de IL-6, reflejando un bucle de retroalimentación local que limitaría la respuesta pro-inflamatoria. El pequeño tamaño muestral de nuestro estudio fue, probablemente, lo que impidió que pudiéramos encontrar una correlación inversa entre los niveles de ARNm  $\alpha 7$  e IL-1ra.

Curiosamente, los niveles de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP y los valores de RMSSD y nHF en los pacientes sépticos se correlacionaron inversamente con los valores del APACHE II, a la vez que se asociaron negativamente con la gravedad de la enfermedad (Fig. 18B) y con la mortalidad (Fig. 18C). Estos hallazgos posiblemente explican por qué los pacientes del primer tercil (alta actividad de CAP), además de un mejor control de la inflamación, tienen mejor pronóstico. De hecho, ninguno de los pacientes del

primer tercil desarrolló sepsis grave, mientras que la mayoría de los pacientes (70%) cuya enfermedad progresó hasta sepsis grave y todos los que finalmente murieron pertenecían al tercer tercil (Tabla 4). Además, la alta sensibilidad y especificidad de los niveles de  $\alpha 7$  en pacientes (con un valor de corte de 3) en relación a la mortalidad sugiere que estos niveles pueden tener un valor predictivo de mortalidad en la sepsis. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales, con mayor número de pacientes, para poder confirmar este hallazgo preliminar.

Nuestro estudio también proporciona nuevos e interesantes hallazgos sobre la participación de la CAP en sepsis humana. Hasta la fecha, sólo dos estudios preliminares, realizados en un modelo de endotoxemia humana, han abordado este tema obteniendo efectos beneficiosos limitados tras la estimulación de la CAP con agonistas del  $\alpha 7$  nAChR (Wittebole y col., 2007; Kox y col., 2011). La discrepancia entre estos resultados y los obtenidos en nuestro estudio puede explicarse por el modelo de inflamación estéril que utilizaron los anteriores autores, modelo que no reproduce fielmente lo que sucede realmente en sepsis humana. Se desconoce aún el mecanismo que subyace en la expresión diferencial del gen *CHRNA7* en pacientes sépticos. Ya que la edad y el sexo no parecen estar implicados en la anterior expresión diferencial (Tabla 4), solo quedan tres posibles alternativas, dos de ellas basadas en una predisposición genética y una tercera de base no genética. Polimorfismos en la región promotora y/o potenciadora del gen podrían alterar la eficacia transcripcional (Sinkus y col., 2011; Haraksingh y Snyder, 2013), o bien podría existir algún tipo de regulación dependiente de micro ARNs (miARN) (Gurtan y Sharp, 2013; Sfera y col., 2015). La tercera posibilidad se basaría en la reciente identificación de una subpoblación de linfocitos reguladores ( $CD3^+ CD4^+ CD25^-$ ) que, a través de sus  $\alpha 7$  nAChR, parecen ser claves a la hora de controlar la inflamación sistémica en sepsis experimental en roedores por parte del nervio vago (Peña y col., 2011). Dado que en pacientes sépticos que fallecen se ha encontrado una apoptosis masiva y persistente de la anterior subpoblación de linfocitos (Venet y col., 2004), este mecanismo podría contribuir a la depleción de los niveles  $\alpha 7$  encontrado en nuestros pacientes con peor pronóstico. Para poder implicar a alguno de los anteriores mecanismos en la expresión diferencial del gen *CHRNA7* en pacientes sépticos se requieren estudios adicionales.

Nuestro grupo estableció, por primera vez, el papel modulador endógeno negativo que  $\alpha 7$  ejerce sobre la actividad del  $\alpha 7$  nAChR en un modelo heterólogo de



expresión, como los ovocitos de rana *Xenopus laevis* (de Lucas-Cerrillo y col., 2011). Esta capacidad reguladora de dup $\alpha$ 7 sobre la actividad del  $\alpha$ 7 nAChR en ovocitos fue refrendada unos meses después por otro grupo (Araud y col., 2011). Posteriormente, datos *in vitro* de nuestro propio laboratorio han ratificado la capacidad de dup $\alpha$ 7 para revertir el efecto antiinflamatorio mediado por el  $\alpha$ 7 nAChR en macrófagos murinos estimulados con LPS (Maldifassi 2014). Los resultados del presente estudio demuestran, por primera vez en sepsis humana, que los niveles de expresión de dup $\alpha$ 7 ARNm en CMSP se correlacionan inversamente con los de  $\alpha$ 7 y también con el estado inflamatorio del paciente (Fig. 19). Estos resultados sugieren que la subunidad dup $\alpha$ 7 podría desempeñar un papel fisiopatológico *in vivo* al interferir con el  $\alpha$ 7 nAChR expresado en células inmunes. Este mecanismo podría explicar, al menos parcialmente, por qué los pacientes sépticos del tercer tercil (altos niveles de dup $\alpha$ 7 y bajos niveles de  $\alpha$ 7 en sus CMSP) son incapaces de controlar la respuesta inflamatoria y la progresión de la enfermedad.

Resultados similares a los nuestros han sido obtenidos recientemente en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales (Baird y col., 2016). En dicho estudio, los investigadores encontraron un incremento significativo de expresión de dup $\alpha$ 7 ARNm en biopsias de pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn y una reducción de los niveles de  $\alpha$ 7 ARNm en las muestras de colitis ulcerosa. Estudios epidemiológicos han relacionado estas dos enfermedades intestinales con el consumo del tabaco. Así, la mayoría de los pacientes con colitis ulcerosa son no fumadores (Motley y col., 1988; Rubin y Hanauer, 2000), mientras que los que sí fuman presentan síntomas menos severos de la enfermedad (Wolf y Lashner, 2002). Se ha observado que la aplicación de parches de nicotina en los anteriores pacientes reduce la inflamación (Pullan y col., 1994; Thomas y col., 2005; Ingram y col., 2008). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en modelos experimentales de endotoxemia o sepsis, en donde se demuestra que la activación del  $\alpha$ 7 nAChR con agonistas nicotínicos produce un importante efecto antiinflamatorio (Wang y col., 2004; Yoshikawa y col., 2006; Pavlov y col., 2007; Parrish y col., 2008b; van der Zanden y col., 2012). Dado que la exposición de los macrófagos humanos a nicotina y LPS disminuye la expresión de dup $\alpha$ 7 ARNm en estas células (de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Benfante y col., 2011; van der Zanden y col., 2012), se podría asumir que la activación de la CAP, ya sea por estimulación del nervio vago ó por agonistas nicotínicos, conduciría a la disminución de

los niveles de  $\alpha 7$  ARNm para permitir una adecuada actividad antiinflamatoria del  $\alpha 7$  nAChR.

Como es bien conocido, las limitaciones inherentes al diseño de cualquier estudio piloto, como lo es el nuestro, son el relativamente pequeño tamaño muestral y la imposibilidad de establecer relación de causalidad. Otra limitación es la presencia de factores de confusión que pueden influir en las medidas de HRV, algo que nosotros hemos tratado de minimizar en nuestro estudio. Por el contrario, algunas fortalezas notables de nuestro estudio son: a) el ensayo de qPCR es altamente específico para determinar los niveles de expresión de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP; b) la asociación positiva, y altamente significativa, entre los niveles de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP y los índices de actividad vagal cardíaca, medidos simultáneamente en cada sujeto; c) la correlación negativa, fuertemente significativa, entre los anteriores marcadores de actividad de la CAP y el estado inflamatorio neto del paciente; d) el uso de tres fuentes diferentes del organismo para determinar la actividad de la CAP (CMSP circulante, corazón y suero sanguíneo); y e) la determinación en cada paciente, y a dos tiempos distintos (enfermedad aguda y tras la recuperación), de los niveles de  $\alpha 7$  en CMSP y los índices de HRV, lo que permite que cada paciente sea un control interno para sí mismo.

En resumen, nuestros resultados son consistentes con la idea de que una respuesta colinérgica antiinflamatoria deficiente frente a la inflamación sistémica puede estar en la raíz del mal pronóstico de muchos de los pacientes sépticos. En consecuencia, nuestro estudio plantea la posibilidad de que la activación de la CAP en pacientes sépticos de "alto riesgo" podría tener potencial terapéutico. Este tipo de actuación podría utilizarse como terapia adyuvante para aumentar la eficacia terapéutica de los tratamientos convencionales en sepsis.

## 2. LA SUBUNIDAD Dup $\alpha$ 7 REGULA NEGATIVAMENTE LA ACTIVIDAD TUMOROGÉNICA MEDIADA POR EL $\alpha$ 7 nAChR EN CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS.

El presente estudio demuestra, por primera vez, que la subunidad dup $\alpha$ 7 puede desempeñar un papel fisiopatológico en el desarrollo de tumores relacionados con el consumo de tabaco, como sería el caso de los carcinomas de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Nuestros hallazgos, derivados de la combinación de experimentos *in vitro*, *in vivo* y clínicos, permiten establecer que dup $\alpha$ 7 ejerce su anterior efecto interfiriendo con la actividad tumorogénica mediada por el  $\alpha$ 7 nAChR, tal como hemos demostrado previamente que ocurre en ovocitos de *Xenopus* y en macrófagos murinos (de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Maldifassi 2014).

El consumo del tabaco es de suma importancia en el desarrollo y progresión tumoral, y la activación del  $\alpha$ 7 nAChR, por medio de los componentes del tabaco nicotina y NNK, favorece esta progresión tumoral. Estudios previos describen que tras la activación del  $\alpha$ 7 nAChR, se aumenta la expresión de múltiples factores de transcripción de proliferación y antiapoptosis. Nuestros resultados demuestran que tras la estimulación con nicotina y NNK, la proliferación de nuestras líneas celulares de AD y SCC aumenta. Estos datos están refrendados con los resultados de diversos autores en una gran cantidad de líneas celulares de cáncer de pulmón (Jull y col., 2001; Tsurutani y col., 2005; Dasgupta y col., 2006b; Eggleton y col., 2008; Dasgupta y col., 2009; Davis y col., 2009; Cardinale y col., 2012; Pillai y Chellappan 2012; Nakada y col., 2012) y de cáncer nasofaríngeo, colon, gástrico, vejiga, páncreas, hígado y de mama (Shin y col., 2004; Wong y col., 2007; Chen y col., 2008; Dasgupta y col., 2009; Shi y col., 2012; Cucina y col., 2012; Al-Wadei y col., 2012c; Martinez y col., 2017).

Múltiples líneas de investigación describen que el hábito tabáquico aparte de facilitar la proliferación, también favorece la propagación de metástasis. Una disminución en la expresión de proteínas epiteliales (como E-Cadherina y  $\beta$ -catenina) y un aumento de proteínas mesenquimales (Vimentina y Fibronectina) conlleva que las células tumorales puedan proliferar independientemente de sustrato, lo cual lleva a las células a migrar e invadir con mayor facilidad. Esta transición epitelio-mesenquimal en las células es un proceso que se asocia a un peor pronóstico en diversos tumores (Strathdee 2002). Así, se ha descrito que la nicotina es un potente agente inductor de la

transición epitelio-mesenquimal en múltiples líneas celulares de cáncer de pulmón (Davis y col., 2009; Dasgupta y col., 2009; Pillai y col., 2011; Pillai y col., 2015; Zhang y col., 2016) y cáncer gástrico (Lien y col., 2011). Hemos observado también en nuestros resultados que la nicotina aumenta la expresión de dos marcadores mesenquimales, vimentina y fibronectina, sin embargo, somos los primeros en observar dicha transición inducida por la nitrosamina NNK en líneas celulares de NSCLC, ya que hasta ahora sólo se le había atribuido esta función en líneas tumorales gástricas (Wang y col., 2012).

Continuando con esto, múltiples grupos han observado que tanto la nicotina como el NNK aumentan la migración en líneas celulares de cáncer de pulmón (Dasgupta y col., 2009; Pillai y col., 2011; Shen y col., 2012; Pillai y col., 2015; Zhang y col., 2016) y cáncer de mama y gástrico (Dasgupta y col., 2009; Lien y col., 2011; Wang y col., 2012). Así, nosotros observamos también un aumento de la migración con los estímulos de nicotina y NNK en nuestras líneas celulares.

Por último, el crecimiento tumoral de las células A549 en los ratones inmunodeficientes tratados con nicotina fue superior (aunque no estadísticamente significativo) a la de los animales que sólo recibieron sacarina (Fig. 27), aumento que ya había sido descrito por una gran variedad de grupos de investigación en líneas celulares de pulmón (Paleari y col., 2008; Davis y col., 2009; Nakada y col., 2012; Lau y col., 2013; Liu y col., 2015) y cáncer de mama, vejiga e hígado (Lee y col., 2010; Yuge y col., 2015; Martinez y col., 2017). Así también, los marcadores de proliferación (Ki67) y de angiogénesis (VEGF) fueron superiores también en los tumores de los animales que recibieron nicotina frente a los que no fueron tratados, efectos que como se discutió anteriormente, la nicotina tiene un potente efecto proliferativo, pero que también incrementa la angiogénesis en gran variedad de modelos experimentales (Heeschen y col., 2001; Zhu y col., 2003; Jarzynka y col., 2006; Zhang y col., 2007).

Así también, los resultados de algunos de estos grupos, demuestran que el silenciamiento del  $\alpha 7$  nAChR, ya sea con antagonistas específicos de este receptor (como la mecamilamina ó la  $\alpha$ -bungarotoxina) o con ARN de interferencia, previene el aumento en la proliferación (Cattaneo y col., 1993; Codignola y col., 1994; Jull y col., 2001; Dasgupta y col., 2006b; Zheng y col., 2007; Davis y col., 2009), migración (Xu y Deng, 2006; Lien y col., 2011; Wang y col., 2012; Shen y col., 2012; Zhang y col., 2016), transición epitelio-mesenquimal (Pillai y col., 2015; Zhang y col., 2016) y

angiogénesis (Heeschen y col., 2001; Zhu y col., 2003; Brown y col., 2012) inducida por nicotina y NNK.

Con todo esto, se concluye que la activación del  $\alpha 7$  nAChR es de suma importancia para muchos procesos tumorales *in vivo* e *in vitro*; sin embargo, el papel modulador de su duplicado parcial, dup $\alpha 7$ , no había sido investigado hasta ahora. Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión del dup $\alpha 7$  en las líneas celulares A549 y SK-MES-1 bloquea los efectos debidos a la nicotina y NNK en la proliferación, migración, ensayo de la herida, transición epitelio-mesenquimal, crecimiento tumoral y angiogénesis (Figs. 21–28). Se muestra como en los experimentos de proliferación, migración (herida y Transwell) y en la transición epitelio-mesenquimal, tras los estímulos de nicotina y NNK aumentan estas propiedades en las células control, mientras que en las células sobreexpresantes de dup $\alpha 7$ , este efecto se ve inhibido. En los resultados del crecimiento tumoral hay que resaltar que en los tumores de las células sobreexpresantes del dup $\alpha 7$ , el tamaño tumoral de estas células siempre estuvo por debajo del de las células control (con o sin nicotina), lo cual puede explicarse con los resultados del marcaje de los marcadores de proliferación y angiogénesis, ya que como se ha mencionado antes, las propiedades proliferativas y angiogénicas de células tumorales se inhiben bloqueando al  $\alpha 7$  nAChR (Cattaneo y col., 1993; Codignola y col., 1994; Jull y col., 2001; Zhu y col., 2003; Dasgupta y col., 2006b; Zheng y col., 2007; Davis y col., 2009; Brown y col., 2012), por lo que la inhibición en la función del  $\alpha 7$  nAChR por la sobreexpresión del dup $\alpha 7$ , daría un efecto conjunto de la inhibición de ambas propiedades, por lo que estos tumores crecerían peor que las células control.

Se puede considerar que el efecto inhibitorio del dup $\alpha 7$  sobre las propiedades tumorogénicas antes mencionadas es a través del bloqueo en la función del  $\alpha 7$  nAChR debido a: 1) Gracias a resultados propios y de otros grupos (Maldifassi 2014; Wang y col., 2014) hemos confirmado que la subunidad dup $\alpha 7$  colocaliza con la subunidad  $\alpha 7$  en membrana celular y esta colocalización da lugar a receptores heteroméricos  $\alpha 7$ -dup $\alpha 7$  con función alterada respecto al receptor homomérico  $\alpha 7$ . Se ha descrito que el dup $\alpha 7$  puede interaccionar con las subunidades nicotínicas  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  (Wang y col., 2014), y en nuestros experimentos, no podemos descartar que esta interacción pueda llegar a ocurrir. Sin embargo, ya que observamos un bloqueo en el efecto estimulante del NNK (agonista preferencial del  $\alpha 7$  nAChR), nos permite asegurar que el efecto inhibitorio del dup $\alpha 7$  es principalmente a través de este receptor.

Se ha descrito que el NNK puede llegar a activar a receptores  $\beta$ -adrenérgicos de líneas celulares de cáncer de páncreas (Askari y col., 2005) y de pulmón (Schuller y col., 1999; Al-Wadei y col., 2010) aumentando la proliferación y migración de estas. Sin embargo, si el NNK actuara por este mecanismo en nuestras células, la sobreexpresión de dup $\alpha$ 7 no bloquearía los efectos estimulantes del NNK. Así, podemos confirmar que la sobreexpresión de dup $\alpha$ 7 bloquea las propiedades tumorogénicas estudiadas principalmente mediante el bloqueo del  $\alpha$ 7 nAChR.

Aunque apenas muy pocos grupos hemos descrito la función del dup $\alpha$ 7, nosotros y otros grupos hemos descrito su función de modulación negativa sobre el  $\alpha$ 7 nAChR (de Lucas-Cerrillo y col., 2011; Araud y col., 2011; Maldifassi 2014), sin embargo, recientemente un grupo cuestionó estos resultados, en los que ellos afirman que el coensamblaje del dup $\alpha$ 7 con la subunidad  $\alpha$ 7 en células Neuro2a forman receptores heteroméricos funcionales con respuestas alteradas a colina y vareniclina, pero con respuestas normales a ACh.

La diferencia de sus resultados con los nuestros podría deberse: 1) Ellos usan un modelo de células Neuro2a, las cuales son células de mamífero y en nuestros experimentos iniciales se utilizó un modelo heterólogo de *Xenopus laevis*, en dónde se expresa exclusivamente los receptores de los cuales el ARNm fue insertado, mientras que en células de mamífero cuentan con receptores propios de su tejido. Así, los niveles de expresión del ARNm y proteína de  $\alpha$ 7 y dup $\alpha$ 7 en células de mamífero varía entre los diferentes tejidos, siendo en macrófagos la expresión de dup $\alpha$ 7 mayor que la de  $\alpha$ 7, mientras que en células neuronales, la expresión endógena de  $\alpha$ 7 es mucho mayor que la del dup $\alpha$ 7 (de Lucas-Cerrillo y col., 2011). Por lo que en su modelo neuronal, al contar con una mayor cantidad endógena de  $\alpha$ 7 y al usar un ratio de transfección 1:1  $\alpha$ 7:dup $\alpha$ 7 (dup $\Delta\alpha$ 7), se favorece la expresión de  $\alpha$ 7 sobre la de dup $\alpha$ 7; 2) También habría que considerar que la subunidad dup $\alpha$ 7 carece de elementos importantes para que su ensamblaje e inserción en membrana se realice fácilmente, por lo que es posible que la poca expresión de dup $\alpha$ 7 y la menor cantidad de subunidades de dup $\alpha$ 7 que lleguen a insertarse en el  $\alpha$ 7 nAChR, no logre tener un efecto negativo sobre la funcionalidad del receptor (Murray y col., 2012); 3) en nuestros estudios realizados usando células de mamífero (macrófagos y líneas celulares de cáncer de pulmón) se les realizó una sola transfección para obtener una sobreexpresión de dup $\alpha$ 7 solamente, evitando realizar una

doble (ó triple) transfección y desigualdades en la inserción y traducción de los plásmidos en todas las células.

Lamentablemente en estos momentos somos incapaces de confirmar la vía, o combinación de vías, por la que el dup $\alpha$ 7 inhiba las propiedades tumorogénicas antes estudiadas. La activación del  $\alpha$ 7 nAChR desencadena una gran variedad de vías de señalización (Src, PI3K/Akt, JAK/STAT y MAPK) en líneas celulares de cáncer de pulmón, las cuales se encuentran muy interconectadas entre sí, por lo que el bloqueo del dup $\alpha$ 7 sobre este receptor actuaría en diversos factores de transcripción, si no es que en todos. En la bibliografía no existen datos que relacionen directamente al dup $\alpha$ 7 con alguna de estas vías de señalización en cualquier modelo de investigación, por lo que el mecanismo de bloqueo del dup $\alpha$ 7 es de gran interés para obtener mayor información para una posible diana terapéutica.

Una vez confirmado el papel modulador del dup $\alpha$ 7 sobre el  $\alpha$ 7 nAChR *in vitro* e *in vivo*, nos postulamos a averiguar si esta modulación ocurre en la clínica actual. Los niveles de expresión del  $\alpha$ 7 y dup $\alpha$ 7 ARNm fueron analizados en un conjunto de muestras de biopsias sanas y tumorales de NSCLC. En las Figuras 29 y 30 se puede observar como la expresión del  $\alpha$ 7 nAChR aumenta significativamente en las muestras tumorales de SCC con respecto a sus controles no tumorales, datos que concuerdan con los resultados de otros autores (Paleari y col., 2008; Brown y col., 2013; Schaal y Chellappan, 2016). En las muestras de AD, la expresión del  $\alpha$ 7 nAChR no es estadísticamente diferente que a la de sus muestras no tumorales, datos que concuerdan con los datos de otro grupo que tampoco observaron diferencias significativas (Lam y col., 2007). Los niveles de expresión normalizados de las muestras de AD demuestran un ligero aumento de la subunidad  $\alpha$ 7, pero dicho aumento de expresión no es de tal magnitud como las del SCC. De hecho, estos niveles de expresión (SCC>AD>NT) ya habían sido descritos en la bibliografía (Paleari y col., 2008; Russo y col., 2012), no obstante, estos grupos sí observaron diferencias estadísticas entre sus muestras tumorales y no tumorales. Las diferencias de nuestros resultados y de los otros grupos se pueden deber a las siguientes variables: 1) nuestro estudio incluye muestras tumorales y no tumorales pareadas, en las que ambas son del mismo paciente; mientras que en el resto de los estudios analizan muestras de personas distintas, y como se puede observar en la expresión del  $\alpha$ 7 de la Figura 30, la variabilidad de expresión entre las muestras es muy grande por lo que se podrían opacar ciertas diferencias de expresión

por la propia expresión del individuo y 2) nuestro estudio incluye la misma cantidad de muestras tumorales y no tumorales, mientras que los otros grupos usan una cantidad mucho menor de muestras no tumorales (siete y una muestras respectivamente) por lo que las diferencias en el tamaño muestral entre los grupos quizá sea la razón por la que observan estas diferencias estadísticas.

Así también, en estas gráficas se representa la expresión del duplicado parcial de la subunidad  $\alpha 7$ , dup $\alpha 7$ . La expresión normalizada del dup $\alpha 7$  tanto en las muestras de SCC y AD disminuye con respecto a su basal, siendo esta disminución estadísticamente significativa en ambos casos. En la Figura 30 se representan el número de copias del dup $\alpha 7$  en las muestras tumorales de AD y SCC frente a sus contrapartes no tumorales. Se puede observar como el número de copias del dup $\alpha 7$  disminuye estadísticamente en los dos tipos tumorales frente a sus basales. Estos resultados, a fecha de Abril del 2017, son totalmente innovadores, ya que hasta la fecha no se ha descrito la posible función y regulación del dup $\alpha 7$  en el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

En la bibliografía sólo existe un estudio que haya observado los niveles de expresión de dup $\alpha 7$  en una enfermedad tumoral (Baird y col., 2016). Este grupo estudió la expresión de dup $\alpha 7$  y  $\alpha 7$  en muestras tumorales de cáncer de colon y en muestras no tumorales, sin embargo no observaron diferencias de expresión en ambas subunidades entre las muestras tumorales y sanas (Baird y col., 2016).

El cáncer de pulmón está asociado directa y claramente con el consumo del tabaco, mientras que esta asociación no esta totalmente definida en el cáncer de colon (Liang y col., 2009, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health 2014). Dentro del NSCLC, el SCC es el tipo histológico que más se encuentra relacionado con el consumo del tabaco, mientras que el AD se asocia más a pacientes no fumadores y a fumadores pasivos (Freedman y col., 2016). Así, nuestras muestras tumorales están en mayor contacto directo con los componentes del tabaco, nicotina y NNK, componentes a los cuales se les ha descrito que provocan un aumento de expresión del  $\alpha 7$  nAChR en muestras tumorales de pulmón (Al-Wadei y col., 2010; Aizawa y col., 2013; Brown y col., 2013; Schaal y Chellappan 2016) y en otros tipos celulares (Gentry y Lukas 2002; Govind y col., 2009). De hecho, se ha descrito la disminución en la expresión del dup $\alpha 7$  en monocito y macrófagos tratados con nicotina (Severance y col., 2009; de Lucas-Cerrillo y col., 2011), por lo que se puede asumir, que la mayor probabilidad de contacto con



estos componentes en nuestras muestras (especialmente el SCC) sean las responsables de la modificación de expresión de estas subunidades y no en las de cáncer de colon.

Los niveles de expresión del ARNm del  $\alpha 7$  y del dup $\alpha 7$  han sido estudiados en pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) y enfermedades psiquiátricas (esquizofrenia y trastorno bipolar) (Kunii y col., 2015; Baird y col., 2016). En dichos estudios se observan niveles inversos de expresión de ambos mensajeros, en donde dup $\alpha 7$  tiene una expresión mayor en las muestras de los pacientes comprando frente a controles sanos, mientras que la expresión de la subunidad  $\alpha 7$  se encuentra disminuida en los pacientes frente a los controles. Así también, los niveles de expresión de ambos mensajeros en nuestros pacientes sépticos presentan este patrón de expresión. Estos resultados resaltarían la posible función negativa *in vivo* que podría ejercer dup $\alpha 7$  sobre las funciones de neurotransmisión y modulación inflamatoria sobre el  $\alpha 7$  nAChR en estas enfermedades. Con todo lo anterior, la disminución en la expresión de dup $\alpha 7$  en las muestras tumorales de NSCLC favorecería el efecto protumorigénico del  $\alpha 7$  nAChR.

En conclusión, se puede confirmar que la sobreexpresión del dup $\alpha 7$  en líneas celulares de cáncer de pulmón inhibe los efectos protumorigénicos de la nicotina y el NNK a través del  $\alpha 7$  nAChR. Además, existe una modulación *in vivo* de ambos mensajeros en biopsias humanas de cáncer de células no pequeñas de pulmón.

# Conclusiones

Las conclusiones principales del presente trabajo de Tesis Doctoral son las siguientes:

- 1) Los niveles de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP de los pacientes sépticos constituyen un excelente marcador de la actividad de la vía colinérgica antiinflamatoria.
- 2) Los pacientes sépticos que presentan niveles de expresión más altos de  $\alpha 7$  ARNm en CMSP muestran un mejor control de la inflamación y mejor pronóstico.
- 3) El nivel de expresión de  $\text{dup}\alpha 7$  ARNm en CMSP de los pacientes sépticos se correlaciona inversamente con la expresión de  $\alpha 7$  ARNm y, directamente, con el grado de inflamación y la gravedad de la enfermedad.
- 4) La sobreexpresión de  $\text{dup}\alpha 7$  en líneas celulares de NSCLC bloquea, tanto *in vitro* como *in vivo*, la progresión tumoral secundaria a la activación del  $\alpha 7$  nAChR por nicotina y/o NNK.
- 5) La evaluación de los niveles de expresión de los mensajeros de  $\alpha 7$  y  $\text{dup}\alpha 7$  en biopsias pareadas de pulmón de pacientes con NSCLC revela una disminución de expresión de  $\text{dup}\alpha 7$  y una sobreexpresión de  $\alpha 7$  en las muestras tumorales respecto a las no tumorales.

En conjunto, los resultados de esta Tesis revelan la implicación fisiopatológica de la modulación del  $\alpha 7$  nAChR por parte del  $\text{dup}\alpha 7$ , tanto en el control de la inflamación como en el desarrollo tumoral asociado al consumo del tabaco.

# Conclusions

The main conclusions of this doctoral thesis are the following:

- 1) The expression level of  $\alpha 7$  mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of septic patients is a excellent biomarker of the cholinergic antiinflammatory pathway.
- 2) Septic patients with a higher expression level of  $\alpha 7$  mRNA in PBMC have improved inflammatory control and a better prognosis of recovery .
- 3) The expression level of dup $\alpha 7$  mRNA in PBMC of septic patients is inversely correlated with the expression of  $\alpha 7$  mRNA and directly correlated with the inflammatory state and disease severity.
- 4) The overexpression of dup $\alpha 7$  in NSCLC cell lines blocks, both *in vitro* and *in vivo*, the tumoral progression secondary to the activation of  $\alpha 7$  nAChR by nicotine or NNK.
- 5) The evaluation of  $\alpha 7$  and dup $\alpha 7$  mRNAs in paired lung biopsies of patients with NSCLC show that dup $\alpha 7$  expression levels are decreased and  $\alpha 7$  increased in the tumoral samples compared to the non-tumoral samples.

These results reveal the pathophysiological implication of the  $\alpha 7$  nAChR-modulation by dup $\alpha 7$  in the control of inflammation as well as in the tumoral progression associated with tobacco consumption.

# **Bibliografía**

- Adler LE, Olincy A, Waldo M, Harris JG, Griffith J, Stevens K, Flach K, Nagamoto H, Bickford P, Leonard S, *et al.* (1998). Schizophrenia, sensory gating, and nicotinic receptors. *Schizophr Bull* 24, 189-202.
- Aizawa K, Liu C, Veeramachaneni S, Hu KQ, Smith DE, Wang XD (2013). Development of ferret as a human lung cancer model by injecting 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Lung Cancer* 82, 390-396.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* 89, 73-120.
- Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX (1997). Choline is a selective agonist of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci* 9, 2734-42.
- Al-Wadei HA, Schuller HM (2009). Nicotinic receptor-associated modulation of stimulatory and inhibitory neurotransmitters in NNK-induced adenocarcinoma of the lungs and pancreas. *J Pathol* 218, 437-45.
- Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Masi T, Schuller HM (2010). Chronic exposure to estrogen and the tobacco carcinogen NNK cooperatively modulates nicotinic receptors in small airway epithelial cells. *Lung Cancer* 69, 33-9.
- Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Schuller HM (2012a). Cooperative regulation of non-small cell lung carcinoma by nicotinic and beta-adrenergic receptors: A novel target for intervention. *PLoS One* 7, e29915.
- Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Ullah MF, Schuller HM (2012b). Gamma-amino butyric acid inhibits the nicotine-imposed stimulatory challenge in xenograft models of non-small cell lung carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets* 12, 97-106.
- Al-Wadei MH, Al-Wadei HA, Schuller HM (2012c). Pancreatic cancer cells and normal pancreatic duct epithelial cells express an autocrine catecholamine loop that is activated by nicotinic acetylcholine receptors  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , and  $\alpha 7$ . *Mol Cancer Res* 10, 239-249.
- Anderson DJ, Blobel G (1981). In vitro synthesis, glycosylation, and membrane insertion of the four subunits of torpedo acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5598-5602.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001). Epidemiology of severe sepsis in the united states: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29, 1303-1310.
- Annan D, Trabold F, Sharshar T, Jarrin I, Blanc AS, Raphael JC, Gajdos P (1999). Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: A spectral analysis approach. *Am J Respir Crit Care Med* 160, 458-465.
- Araud T, Graw S, Berger R, Lee M, Neveu E, Bertrand D, Leonard S (2011). The chimeric gene CHRFAM7A, a partial duplication of the CHRNA7 gene, is a dominant negative regulator of  $\alpha 7$  nAChR function. *Biochem Pharmacol* 82, 904-914.
- Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA (2006). Receptor-mediated tobacco toxicity: Cooperation of the ras/raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of  $\alpha 7$  nicotinic receptor in oral keratinocytes. *Faseb J* 20, 2093-2101.
- Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA (2008). Receptor-mediated tobacco toxicity: Acceleration of sequential expression of  $\alpha 5$  and  $\alpha 7$  nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke. *Faseb J* 22, 1356-1368.

- Askari MD, Tsao MS, Schuller HM (2005). The tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone stimulates proliferation of immortalized human pancreatic duct epithelia through beta-adrenergic transactivation of EGF receptors. *J Cancer Res Clin Oncol* 131, 639-648.
- Baird A, Coimbra R, Dang X, Eliceiri BP, Costantini TW (2016). Up-regulation of the human-specific CHRFAM7A gene in inflammatory bowel disease. *BBA Clin* 5, 66-71.
- Becker JU, Theodosis C, Jacob ST, Wira CR, Groce NE (2009). Surviving sepsis in low-income and middle-income countries: New directions for care and research. *Lancet Infect Dis* 9, 577-582.
- Benfante R, Antonini R, De Pizzol M, Gotti C, Clementi F, Locati M, Fornasari D (2011). Expression of the  $\alpha 7$  nAChR subunit duplicate form (CHRFAM7A) is down-regulated in the monocytic cell line THP-1 on treatment with LPS. *J Neuroimmunol* 230, 74-84.
- Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, Saccone NL, Saccone SF, Bertelsen S, Fox L, *y col.* (2008). Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* 165, 1163-1171.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. the ACCP/SCCM consensus conference committee. american college of chest physicians/society of critical care medicine. *Chest* 101, 1644-1655.
- Bonham AC, Hasser EM (1993). Area postrema and aortic or vagal afferents converge to excite cells in nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol* 264, H1674-1685.
- Bordas A., Cedillo JL., Arnalich F., Esteban Rodriguez I., Guerra-Pastrian L., de Castro J., Martín-Sánchez C., Atienza G, Fernández-Capitán C, Rios JJ *y col.* (2017). Expression Patterns for Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Genes in Smoking-Related Lung Cancers. *Oncotarget*. En prensa
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458-462.
- Bouza C, Lopez-Cuadrado T, Saz-Parkinson Z, Amate-Blanco JM (2015). Epidemiology and recent trends of severe sepsis in Spain: A nationwide population-based analysis (2006-2011). *BMC Infect Dis* 14:717.
- Bray C, Son JH, Meizel S (2005). Acetylcholine causes an increase of intracellular calcium in human sperm. *Mol Hum Reprod* 11, 881-889.
- Briley MS, Changeux JP (1977). Isolation and purification of the nicotinic acetylcholine receptor and its functional reconstitution into a membrane environment. *Int Rev Neurobiol* 20, 31-63.
- Brisson A, Unwin PN (1984). Tubular crystals of acetylcholine receptor. *J Cell Biol* 99, 1202-1211.
- Broide RS and Leslie FM (1999). The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol* 20, 1-16.
- Brown KC, Perry HE, Lau JK, Jones DV, Pulliam JF, Thornhill BA, Crabtree CM, Luo H, Chen YC, Dasgupta P (2013). Nicotine induces the up-regulation of the  $\alpha 7$ -nicotinic receptor ( $\alpha 7$ -nAChR) in human squamous cell lung cancer cells via the Sp1/GATA protein pathway. *J Biol Chem* 288, 33049-33059.



- Brown KC, Lau JK, Dom AM, Witte TR, Luo H, Crabtree CM, Shah YH, Shiflett BS, Marcelo AJ, Proper NA, *y col.* (2012). MG624, an alpha7-nAChR antagonist, inhibits angiogenesis via the egr-1/FGF2 pathway. *Angiogenesis* 15, 99-114.
- Buisson B, Bertrand D (2001). Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4((beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurosci* 21, 1819-1829.
- Calleja-Macias IE, Kalantari M, Bernard HU (2009). Cholinergic signaling through nicotinic acetylcholine receptors stimulates the proliferation of cervical cancer cells: An explanation for the molecular role of tobacco smoking in cervical carcinogenesis? *Int J Cancer* 124, 1090-1096.
- Cammarota M, Bevilacqua LR, Viola H, Kerr DS, Reichmann B, Teixeira V, Bulla M, Izquierdo I, Medina JH (2002). Participation of CaMKII in neuronal plasticity and memory formation. *Cell Mol Neurobiol* 22, 259-267.
- Cancello R, Zulian A, Maestrini S, Mencarelli M, Della Barba A, Invitti C, Liuzzi A, Di Blasio AM (2012). The nicotinic acetylcholine receptor alpha7 in subcutaneous mature adipocytes: Downregulation in human obesity and modulation by diet-induced weight loss. *Int J Obes (Lond)* 36, 1552-1557.
- Cardarella S, Johnson BE (2013). The impact of genomic changes on treatment of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 188, 770-775.
- Cardinale A, Nastrucci C, Cesario A, Russo P (2012). Nicotine: Specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. *Crit Rev Toxicol* 42, 68-89.
- Castro NG, Albuquerque EX (1995). Alpha-bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophys J* 68, 516-524.
- Cattaneo MG, Codignola A, Vicentini LM, Clementi F, Sher E (1993). Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. *Cancer Res* 53, 5566-5568.
- Cedillo JL, Arnalich F, Martin-Sanchez C, Quesada A, Rios JJ, Maldifassi MC, Atienza G, Renart J, Fernandez-Capitan C, Garcia-Rio F, *y col.* (2015). Usefulness of alpha7 nicotinic receptor messenger RNA levels in peripheral blood mononuclear cells as a marker for cholinergic antiinflammatory pathway activity in septic patients: Results of a pilot study. *J Infect Dis* 211, 146-155.
- Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novère N, *y col.* (2003). Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* 23, 7820-7829.
- Chang HJ, Lynn C, Glass RM (2010). JAMA patient page. sepsis. *Jama* 304, 1856.
- Changeux JP (2010). Allosteric receptors: From electric organ to cognition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 1-38.
- Chen RJ, Ho YS, Guo HR, Wang YJ (2008). Rapid activation of Stat3 and ERK1/2 by nicotine modulates cell proliferation in human bladder cancer cells. *Toxicol Sci* 104, 283-293.
- CLAUSS A (1957). Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol* 17, 237-246.
- Codignola A, Tarroni P, Cattaneo MG, Vicentini LM, Clementi F, Sher E (1994). Serotonin release and cell proliferation are under the control of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in small-cell lung carcinoma cell lines. *FEBS Lett* 342, 286-290.

- Colby T, Koss M, Travis WD (1995). Tumors of the lower respiratory tract armed forces institute of pathology fascicle. 3rd ed. Washington, US: Armed Forces Institute of Pathology.
- Colombo SF, Mazzo F, Pistillo F, Gotti C (2013). Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. *Biochem Pharmacol* 86, 1063-1073.
- Conti E, Tremolizzo L, Santarone ME, Tironi M, Radice I, Zoia CP, Aliprandi A, Salmaggi A, Dominici R, Casati M, *et al.* (2016). Donepezil modulates the endogenous immune response: Implications for alzheimer's disease. *Hum Psychopharmacol* 31, 296-303.
- Corringer PJ, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D (1999). Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 22, 831-843.
- Costantini TW, Dang X, Yurchyshyna MV, Coimbra R, Eliceiri BP, Baird A (2015). A human-specific alpha7-nicotinic acetylcholine receptor gene in human leukocytes: Identification, regulation and the consequences of CHRFAM7A expression. *Mol Med* 21, 323-336.
- Court JA, Martin-Ruiz C, Graham A, Perry E (2000). Nicotinic receptors in human brain: Topography and pathology. *J Chem Neuroanat* 20, 281-298.
- Cucina A, Dinicola S, Coluccia P, Proietti S, D'Anselmi F, Pasqualato A, Bizzarri M (2012). Nicotine stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cell lines through activation of survival pathways. *J Surg Res* 178, 233-241.
- Czyzykowski R, Polowinczak-Przybylek J, Potemski P (2016). Nicotine-induced resistance of non-small cell lung cancer to treatment--possible mechanisms. *Postepy Hig Med Dosw* 70, 186-193.
- da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS (2011). EGFR mutations and lung cancer. *Annu Rev Pathol* 6, 49-69.
- Dang X, Eliceiri BP, Baird A, Costantini TW (2015). CHRFAM7A: A human-specific alpha7-nicotinic acetylcholine receptor gene shows differential responsiveness of human intestinal epithelial cells to LPS. *Faseb J* 29, 2292-2302.
- Dani JA, Bertrand D (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 699-729.
- Dasgupta P, Kinkade R, Joshi B, Decook C, Haura E, Chellappan S (2006a). Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6332-6337.
- Dasgupta P, Rastogi S, Pillai S, Ordonez-Ercan D, Morris M, Haura E, Chellappan S (2006b). Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of src and rb-raf-1 pathways. *J Clin Invest* 116, 2208-2217.
- Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, Banerjee S, Carless M, Kim E, Coppola D, *et al.* (2009). Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 124, 36-45.
- Davis R, Rizwani W, Banerjee S, Kovacs M, Haura E, Coppola D, Chellappan S (2009). Nicotine promotes tumor growth and metastasis in mouse models of lung cancer. *PLoS One* 4, e7524.
- De Backer D, Aldecoa C, Njimi H, Vincent JL (2012). Dopamine versus norepinephrine in the treatment of septic shock: A meta-analysis\*. *Crit Care Med* 40, 725-730.

- de Graan AJ, Loos WJ, Friberg LE, Baker SD, van der Bol JM, van Doorn L, Wiemer EA, van der Holt B, Verweij J, Mathijssen RH (2012). Influence of smoking on the pharmacokinetics and toxicity profiles of taxane therapy. *Clin Cancer Res* 18, 4425-4432.
- de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, *y col.* (2005). Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 6, 844-851.
- de Jonge WJ, Ulloa L (2007). The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* 151, 915-929.
- de Lucas-Cerrillo AM, Maldifassi MC, Arnalich F, Renart J, Atienza G, Serantes R, Cruces J, Snchez-Pacheco A, Andrs-Mateos E, Montiel C (2011). Function of partially duplicated human  $\alpha 7$  nicotinic receptor subunit CHRFAM7A gene: Potential implications for the cholinergic anti-inflammatory response. *J Biol Chem* 286, 594-606.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, *y col.* (2013). Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 39, 165-228.
- Dickinson JA, Kew JN, Wonnacott S (2008). Presynaptic  $\alpha 7$ - and  $\beta 2$ -containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms. *Mol Pharmacol* 74, 348-359.
- Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P (2008). Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: Multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* 29, 151-158.
- Eguchi K, Schwartz JE, Pickering TG, Hoshida S, Ishikawa J, Shimada K, Kario K (2010). Increased heart rate variability during sleep is a predictor for future cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Hypertens Res* 33, 737-742.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.
- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K, International Forum of Acute Care Trialists (2016). Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 193, 259-272.
- Flomen RH, Collier DA, Osborne S, Munro J, Breen G, St Clair D, Makoff AJ (2006). Association study of CHRFAM7A copy number and 2 bp deletion polymorphisms with schizophrenia and bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B, 571-575.
- Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, Bunn PA (2002). Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol* 29, 3-14.
- Fraser R, Müller N, Colman N, Pare P (1999). Pulmonary carcinoma. En: Fraser and pare's diagnosis of diseases of the chest. 4th ed. Philadelphia.
- Freedman ND, Abnet CC, Caporaso NE, Fraumeni JF, Jr, Murphy G, Hartge P, Hollenbeck AR, Park Y, Shiels MS, Silverman DT (2016). Impact of changing US cigarette smoking patterns on incident cancer: Risks of 20 smoking-related cancers among the women and men of the NIH-AARP cohort. *Int J Epidemiol* 45, 846-856.

- Freedman R, Hall M, Adler LE, Leonard S (1995). Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 38, 22-33.
- Funai K, Yokose T, Ishii G, Araki K, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A (2003). Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 27, 978-984.
- Gault J, Robinson M, Berger R, Drebing C, Logel J, Hopkins J, Moore T, Jacobs S, Meriwether J, Choi MJ, *y col.* (1998). Genomic organization and partial duplication of the human alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics* 52, 173-185.
- Gehle VM, Walcott EC, Nishizaki T, Sumikawa K (1997). N-glycosylation at the conserved sites ensures the expression of properly folded functional ACh receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 45, 219-229.
- Gentry CL, Lukas RJ (2002). Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1, 359-385.
- Gillentine MA, Schaaf CP (2015). The human clinical phenotypes of altered CHRNA7 copy number. *Biochem Pharmacol* 97, 352-362.
- Glynn T, Seffrin JR, Brawley OW, Grey N, Ross H (2010). The globalization of tobacco use: 21 challenges for the 21st century. *CA Cancer J Clin* 60, 50-61.
- Godin PJ, Fleisher LA, Eidsath A, Vandivier RW, Preas HL, Banks SM, Buchman TG, Suffredini AF (1996). Experimental human endotoxemia increases cardiac regularity: Results from a prospective, randomized, crossover trial. *Crit Care Med* 24, 1117-1124.
- Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L, International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee, *y col.* (2007). The IASLC lung cancer staging project: Proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2, 706-714.
- Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, Moretti M, Pedrazzi P, Pucci L, Zoli M (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 78, 703-711.
- Govind AP, Vezina P, Green WN (2009). Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: Underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochem Pharmacol* 78, 756-765.
- Grady SR, Salminen O, Lavery DC, Whiteaker P, McIntosh JM, Collins AC, Marks MJ (2007). The subtypes of nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic terminals of mouse striatum. *Biochem Pharmacol* 74, 1235-1246.
- Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383, 713-716.
- Gresner P, Gromadzinska J, Wasowicz W (2009). Reference genes for gene expression studies on non-small cell lung cancer. *Acta Biochim Pol* 56, 307-316.
- Guha P, Bandyopadhyaya G, Polumuri SK, Chumsri S, Gade P, Kalvakolanu DV, Ahmed H (2014). Nicotine promotes apoptosis resistance of breast cancer cells and enrichment of side population cells with cancer stem cell-like properties via a signaling cascade involving galectin-3, alpha9 nicotinic acetylcholine receptor and STAT3. *Breast Cancer Res Treat* 145, 5-22.

- Guo J, Kim D, Gao J, Kurtyka C, Chen H, Yu C, Wu D, Mittal A, Beg AA, Chellappan SP, *y col.* (2013). IKBKE is induced by STAT3 and tobacco carcinogen and determines chemosensitivity in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 32, 151-159.
- Gurtan AM, Sharp PA (2013). The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Biol* 425, 3582-3600.
- Hainaut P, Pfeifer GP (2016). Somatic TP53 mutations in the era of genome sequencing. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, 10.1101/cshperspect.a026179.
- Hamilton M, Wolf JL, Rusk J, Beard SE, Clark GM, Witt K, Cagnoni PJ (2006). Effects of smoking on the pharmacokinetics of erlotinib. *Clin Cancer Res* 12, 2166-2171.
- Haraksingh RR, Snyder MP (2013). Impacts of variation in the human genome on gene regulation. *J Mol Biol* 425, 3970-3977.
- Hecht SS (2003). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 733-744.
- Hecker A, Kullmar M, Wilker S, Richter K, Zakrzewicz A, Atanasova S, Mathes V, Timm T, Lerner S, Klein J, *y col.* (2015). Phosphocholine-modified macromolecules and canonical nicotinic agonists inhibit ATP-induced IL-1 $\beta$  release. *J Immunol* 195, 2325-2334.
- Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FL, Cooke JP (2001). Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 7, 833-839.
- Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP (2002). A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Clin Invest* 110, 527-536.
- Hendrickson LM, Guildford MJ, Tapper AR (2013). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. *Front Psychiatry* 4, 29.
- Heusch WL, Maneckjee R (1998). Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis* 19, 551-556.
- Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C (2005). STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood* 105, 689-696.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, *y col.* (2016). SEER Cancer Statistics Review 1975-2013, National Cancer Institute [Internet]; c2016 [citado 01/04/2017]. Disponible desde: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/).
- Hurst R, Rollema H, Bertrand D (2013). Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther* 137, 22-54.
- Improgo MR, Scofield MD, Tapper AR, Gardner PD (2010). The nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster: Dual role in nicotine addiction and lung cancer. *Prog Neurobiol* 92, 212-226.
- Ingram JR, Rhodes J, Evans BK, Thomas GA (2008). Nicotine enemas for active crohn's colitis: An open pilot study. *Gastroenterol Res Pract* 2008:237185.
- Jarzynka MJ, Guo P, Bar-Joseph I, Hu B, Cheng SY (2006). Estradiol and nicotine exposure enhances A549 bronchioloalveolar carcinoma xenograft growth in mice through the stimulation of angiogenesis. *Int J Oncol* 28, 337-344.

- Jawad I, Luksic I, Rafnsson SB (2012). Assessing available information on the burden of sepsis: Global estimates of incidence, prevalence and mortality. *J Glob Health* 2:010404.
- Jia Y, Sun H, Wu H, Zhang H, Zhang X, Xiao D, Ma X, Wang Y (2016). Nicotine inhibits cisplatin-induced apoptosis via regulating alpha5-nAChR/AKT signaling in human gastric cancer cells. *PLoS One* 11, e0149120.
- Jin Z, Gao F, Flagg T, Deng X (2004). Nicotine induces multi-site phosphorylation of bad in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 279, 23837-23844.
- Jull BA, Plummer HK, 3rd, Schuller HM (2001). Nicotinic receptor-mediated activation by the tobacco-specific nitrosamine NNK of a raf-1/MAP kinase pathway, resulting in phosphorylation of c-myc in human small cell lung carcinoma cells and pulmonary neuroendocrine cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 707-717.
- Karlin A, Cox RN, Dipaola M, Holtzman E, Kao PN, Lobel P, Wang L, Yodh N (1986). Functional domains of the nicotinic acetylcholine receptor. *Ann N Y Acad Sci* 463, 53-69.
- Kawai H, Berg DK (2001). Nicotinic acetylcholine receptors containing alpha 7 subunits on rat cortical neurons do not undergo long-lasting inactivation even when up-regulated by chronic nicotine exposure. *J Neurochem* 78, 1367-1378.
- Kessler W, Diedrich S, Menges P, Ebker T, Nielson M, Partecke LI, Traeger T, Cziupka K, van der Linde J, Puls R, *et al.* (2012). The role of the vagus nerve: Modulation of the inflammatory reaction in murine polymicrobial sepsis. *Mediators Inflamm* 2012:467620.
- Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, Yakel JL (2002). Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol* 540, 425-434.
- Khuder SA (2001). Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: A meta-analysis. *Lung Cancer* 31, 139-148.
- Kim TH, Kim SJ, Lee SM (2014). Stimulation of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor protects against sepsis by inhibiting toll-like receptor via phosphoinositide 3-kinase activation. *J Infect Dis* 209, 1668-1677.
- King JR, Nordman JC, Bridges SP, Lin MK, Kabbani N (2015). Identification and characterization of a G protein-binding cluster in alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 290, 20060-70.
- King JR, Kabbani N (2016). Alpha 7 nicotinic receptor coupling to heterotrimeric G proteins modulates RhoA activation, cytoskeletal motility, and structural growth. *J Neurochem* 138, 532-545.
- Korach M, Sharshar T, Jarrin I, Fouillot JP, Raphael JC, Gajdos P, Annane D (2001). Cardiac variability in critically ill adults: Influence of sepsis. *Crit Care Med* 29, 1380-1385.
- Kox M, Pompe JC, Gordinou de Gouberville MC, van der Hoeven JG, Hoedemaekers CW, Pickkers P (2011). Effects of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 on the innate immune response in humans. *Shock* 36, 5-11.
- Krais AM, Hautefeuille AH, Cros MP, Krutovskikh V, Tournier JM, Birembaut P, Thepot A, Paliwal A, Herceg Z, Boffetta P, *et al.* (2011). CHRNA5 as negative regulator of nicotine signaling in normal and cancer bronchial cells: Effects on motility, migration and p63 expression. *Carcinogenesis* 32, 1388-1395.

- Kubalek E, Ralston S, Lindstrom J, Unwin N (1987). Location of subunits within the acetylcholine receptor by electron image analysis of tubular crystals from *torpedo marmorata*. *J Cell Biol* 105, 9-18.
- Kumar A, Zarychanski R, Light B, Parrillo J, Maki D, Simon D, Laporta D, Lapinsky S, Ellis P, Mirzanejad Y, *y col.* (2010). Early combination antibiotic therapy yields improved survival compared with monotherapy in septic shock: A propensity-matched analysis. *Crit Care Med* 38, 1773-1785.
- Kunii Y, Zhang W, Xu Q, Hyde TM, McFadden W, Shin JH, Deep-Soboslay A, Ye T, Li C, Kleinman JE, *y col.* (2015). CHRNA7 and CHRFA7A mRNAs: Co-localized and their expression levels altered in the postmortem dorsolateral prefrontal cortex in major psychiatric disorders. *Am J Psychiatry* 172, 1122-1130.
- Kuo TB, Lai CJ, Huang YT, Yang CC (2005). Regression analysis between heart rate variability and baroreflex-related vagus nerve activity in rats. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16, 864-869.
- Laborde S, Mosley E, Thayer JF (2017). Heart rate variability and cardiac vagal tone in psychophysiological research - recommendations for experiment planning, data analysis, and data reporting. *Front Psychol* 8:213.
- Lai IC, Hong CJ, Tsai SJ (2001). Association study of nicotinic-receptor variants and major depressive disorder. *J Affect Disord* 66, 79-82.
- Lam DC, Girard L, Ramirez R, Chau WS, Suen WS, Sheridan S, Tin VP, Chung LP, Wong MP, Shay JW, *y col.* (2007). Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in non-small-cell lung cancer reveals differences between smokers and nonsmokers. *Cancer Res* 67, 4638-4647.
- Lanza GA, Cianflone D, Rebuzzi AG, Angeloni G, Sestito A, Ciriello G, La Torre G, Crea F, Maseri A, Stratificazione Prognostica dell'Angina Instabile Study Investigators (2006). Prognostic value of ventricular arrhythmias and heart rate variability in patients with unstable angina. *Heart* 92, 1055-1063.
- Lau JK, Brown KC, Thornhill BA, Crabtree CM, Dom AM, Witte TR, Hardman WE, McNees CA, Stover CA, Carpenter AB, *y col.* (2013). Inhibition of cholinergic signaling causes apoptosis in human bronchioalveolar carcinoma. *Cancer Res* 73, 1328-1339.
- Le Novère N, Corringer PJ, Changeux JP (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53, 447-456.
- Lee B, Lee T, Lee SH, Choi YL, Han J (2016). Clinicopathologic characteristics of EGFR, KRAS, and ALK alterations in 6,595 lung cancers. *Oncotarget* 7, 23874-84.
- Lee CH, Huang CS, Chen CS, Tu SH, Wang YJ, Chang YJ, Tam KW, Wei PL, Cheng TC, Chu JS, *y col.* (2010). Overexpression and activation of the alpha9-nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 102, 1322-1335.
- Leonard S, Gault J, Hopkins J, Logel J, Vianzon R, Short M, Drebing C, Berger R, Venn D, Sirota P, *y col.* (2002). Association of promoter variants in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene with an inhibitory deficit found in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 59, 1085-1096.
- Levy G, Fishman JE, Xu D, Chandler BT, Feketova E, Dong W, Qin Y, Alli V, Ulloa L, Deitch EA (2013). Parasympathetic stimulation via the vagus nerve prevents systemic organ dysfunction by abrogating gut injury and lymph toxicity in trauma and hemorrhagic shock. *Shock* 39, 39-44.

- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, y col. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 31, 1250-1256.
- Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS (2014). US lung cancer trends by histologic type. *Cancer* 120, 2883-2892.
- Li DP, Pan YZ, Pan HL (2001). Acetylcholine attenuates synaptic GABA release to supraoptic neurons through presynaptic nicotinic receptors. *Brain Res* 920, 151-158.
- Li T, Zuo X, Zhou Y, Wang Y, Zhuang H, Zhang L, Zhang H, Xiao X (2010). The vagus nerve and nicotinic receptors involve inhibition of HMGB1 release and early pro-inflammatory cytokines function in collagen-induced arthritis. *J Clin Immunol* 30, 213-20.
- Liang PS, Chen TY, Giovannucci E (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 124, 2406-2415.
- Lien YC, Wang W, Kuo LJ, Liu JJ, Wei PL, Ho YS, Ting WC, Wu CH, Chang YJ (2011). Nicotine promotes cell migration through alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in gastric cancer cells. *Ann Surg Oncol* 18, 2671-2679.
- Lindstrom J, Anand R, Gerzanich V, Peng X, Wang F, Wells G (1996). Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog Brain Res* 109, 125-137.
- Liu W, Yi DD, Guo JL, Xiang ZX, Deng LF, He L (2015). Nuciferine, extracted from nelumbo nucifera gaertn, inhibits tumor-promoting effect of nicotine involving wnt/beta-catenin signaling in non-small cell lung cancer. *J Ethnopharmacol* 165, 83-93.
- Locke DP, Jiang Z, Pertz LM, Misceo D, Archidiacono N, Eichler EE (2005). Molecular evolution of the human chromosome 15 pericentromeric region. *Cytogenet Genome Res* 108, 73-82.
- Losert D, Pratscher B, Soutschek J, Geick A, Vornlocher HP, Muller M, Wacheck V (2007). Bcl-2 downregulation sensitizes nonsmall cell lung cancer cells to cisplatin, but not to docetaxel. *Anticancer Drugs* 18, 755-761.
- Lu FM, Hawkins RD (2006). Presynaptic and postsynaptic  $Ca^{2+}$  and CamKII contribute to long-term potentiation at synapses between individual CA3 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4264-4269.
- Ma X, Jia Y, Zu S, Li R, Jia Y, Zhao Y, Xiao D, Dang N, Wang Y (2014). Alpha5 nicotinic acetylcholine receptor mediates nicotine-induced HIF-1alpha and VEGF expression in non-small cell lung cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 278, 172-179.
- Mackall CL, Fry TJ, Gress RE (2011). Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol* 11, 330-342.
- Maldifassi MC (2014). El receptor nicotínico  $\alpha 7$  y la inflamación: Modulación endógena por  $\alpha 7$  y vías de señalización involucradas. Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid.
- Maldifassi MC, Atienza G, Arnalich F, Lopez-Collazo E, Cedillo JL, Martin-Sanchez C, Bordas A, Renart J, Montiel C (2014). A new IRAK-M-mediated mechanism implicated in the anti-inflammatory effect of nicotine via alpha7 nicotinic receptors in human macrophages. *PLoS One* 9, e108397.
- Marsland AL, Gianaros PJ, Prather AA, Jennings JR, Neumann SA, Manuck SB (2007). Stimulated production of proinflammatory cytokines covaries inversely with heart rate variability. *Psychosom Med* 69, 709-716.



- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003). The epidemiology of sepsis in the united states from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348, 1546-1554.
- Martinelli E, Morgillo F, Troiani T, Ciardiello F (2017). Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK. *Cancer Treat Rev* 53, 61-69.
- Martinez AK, Jensen K, Hall C, O'Brien A, Ehrlich L, White T, Meng F, Zhou T, Greene J, Jr, Bernuzzi F, *y col.* (2017). Nicotine promotes cholangiocarcinoma growth in xenograft mice. *Am J Pathol* 187, 1093-1105.
- Matikas A, Mistriotis D, Georgoulas V, Kotsakis A (2017). Targeting KRAS mutated non-small cell lung cancer: A history of failures and a future of hope for a diverse entity. *Crit Rev Oncol Hematol* 110, 1-12.
- Meregnani J, Clarencon D, Vivier M, Peinnequin A, Mouret C, Sinniger V, Picq C, Job A, Canini F, Jacquier-Sarlin M, *y col.* (2011). Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Auton Neurosci* 160, 82-89.
- Micek ST, Welch EC, Khan J, Pervez M, Doherty JA, Reichley RM, Kollef MH (2010). Empiric combination antibiotic therapy is associated with improved outcome against sepsis due to gram-negative bacteria: A retrospective analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 1742-1748.
- Millar NS, Harkness PC (2008). Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Membr Biol* 25, 279-292.
- Millar NS, Gotti C (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56, 237-246.
- Momi N, Ponnusamy MP, Kaur S, Rachagani S, Kunigal SS, Chellappan S, Ouellette MM, Batra SK (2013). Nicotine/cigarette smoke promotes metastasis of pancreatic cancer through alpha7nAChR-mediated MUC4 upregulation. *Oncogene* 32, 1384-1395.
- Moretti M, Zoli M, George AA, Lukas RJ, Pistillo F, Maskos U, Whiteaker P, Gotti C (2014). The novel alpha7beta2-nicotinic acetylcholine receptor subtype is expressed in mouse and human basal forebrain: Biochemical and pharmacological characterization. *Mol Pharmacol* 86, 306-317.
- Moroni M, Zwart R, Sher E, Cassels BK, Bermudez I (2006). Alpha4beta2 nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: Pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Mol Pharmacol* 70, 755-768.
- Motley RJ, Rhodes J, Kay S, Morris TJ (1988). Late presentation of ulcerative colitis in ex-smokers. *Int J Colorectal Dis* 3, 171-175.
- Murray TA, Bertrand D, Papke RL, George AA, Pantoja R, Srinivasan R, Liu Q, Wu J, Whiteaker P, Lester HA, *y col.* (2012). Alpha7beta2 nicotinic acetylcholine receptors assemble, function, and are activated primarily via their Alpha7-Alpha7 interfaces. *Mol Pharmacol* 81, 175-188.
- Nakada T, Kiyotani K, Iwano S, Uno T, Yokohira M, Yamakawa K, Fujieda M, Saito T, Yamazaki H, Imaida K, *y col.* (2012). Lung tumorigenesis promoted by anti-apoptotic effects of cotinine, a nicotine metabolite through activation of PI3K/akt pathway. *J Toxicol Sci* 37, 555-563.
- PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Non-Small Cell Lung Cancer Treatment. [Internet]; c2017 [citado 01/04/2017]. Disponible desde: <http://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq> .

- National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health (2014). The health Consequences of Smoking—50 years of progress: A report of the surgeon general.
- Naylor EC (2016). Adjuvant therapy for stage I and II non-small cell lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 25, 585-599.
- Naylor EC, Desani JK, Chung PK (2016). Targeted therapy and immunotherapy for lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 25, 601-609.
- Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y, Lindstrom J (2003). Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 63, 332-341.
- Nunan D, Sandercock GR, Brodie DA (2010). A quantitative systematic review of normal values for short-term heart rate variability in healthy adults. *Pacing Clin Electrophysiol* 33, 1407-1417.
- Oddo S, LaFerla FM (2006). The role of nicotinic acetylcholine receptors in alzheimer's disease. *J Physiol Paris* 99, 172-179.
- Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ (2012). Rethinking inflammation: Neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev* 248, 188-204.
- O'Malley M, Healy P, Daignault S, Ramnath N (2013). Cigarette smoking and gemcitabine-induced neutropenia in advanced solid tumors. *Oncology* 85, 216-222.
- Paleari L, Catassi A, Ciarlo M, Cavalieri Z, Bruzzo C, Servent D, Cesario A, Chessa L, Cilli M, Piccardi F, *y col.* (2008). Role of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor in human non-small cell lung cancer proliferation. *Cell Prolif* 41, 936-959.
- Palma E, Bertrand S, Binzoni T, Bertrand D (1996). Neuronal nicotinic alpha 7 receptor expressed in xenopus oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine. *J Physiol* 491, 151-161.
- Parrish WR, Gallowitsch-Puerta M, Czura CJ, Tracey KJ (2008a). Experimental therapeutic strategies for severe sepsis: Mediators and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1144, 210-236.
- Parrish WR, Rosas-Ballina M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yang LH, Hudson L, Lin X, Patel N, Johnson SM, *y col.* (2008b). Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. *Mol Med* 14, 567-574.
- Paterson D, Nordberg A (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* 61, 75-111.
- Pavlov VA, Ochani M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Huston JM, Czura CJ, Al-Abed Y, Tracey KJ (2006). Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5219-5223.
- Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Lin X, Levi J, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Czura CJ, *y col.* (2007). Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Crit Care Med* 35, 1139-1144.
- Peña G, Cai B, Ramos L, Vida G, Deitch EA, Ulloa L (2011). Cholinergic regulatory lymphocytes re-establish neuromodulation of innate immune responses in sepsis. *J Immunol* 187, 718-725.
- Perl O, Ilani T, Strous RD, Lapidus R, Fuchs S (2003). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in schizophrenia: Decreased mRNA levels in peripheral blood lymphocytes. *Faseb J* 17, 1948-1950.

- Perl O, Strous RD, Dranikov A, Chen R, Fuchs S (2006). Low levels of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor mRNA on peripheral blood lymphocytes in schizophrenia and its association with illness severity. *Neuropsychobiology* 53, 88-93.
- Pillai S, Rizwani W, Li X, Rawal B, Nair S, Schell MJ, Bepler G, Haura E, Coppola D, Chellappan S (2011). ID1 facilitates the growth and metastasis of non-small cell lung cancer in response to nicotinic acetylcholine receptor and epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol* 31, 3052-3067.
- Pillai S, Chellappan S (2012). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in angiogenesis and epithelial to mesenchymal transition. *Curr Drug Targets* 13, 671-679.
- Pillai S, Trevino J, Rawal B, Singh S, Kovacs M, Li X, Schell M, Haura E, Bepler G, Chellappan S (2015). Beta-arrestin-1 mediates nicotine-induced metastasis through E2F1 target genes that modulate epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 75, 1009-1020.
- Pontet J, Contreras P, Curbelo A, Medina J, Noveri S, Bentancourt S, Migliaro ER (2003). Heart rate variability as early marker of multiple organ dysfunction syndrome in septic patients. *J Crit Care* 18, 156-163.
- Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT, Newcombe RG, Russell MA, Feyerabend C, Thomas GA (1994). Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 330, 811-815.
- Quik M, Philie J, Choremis J (1997). Modulation of alpha7 nicotinic receptor-mediated calcium influx by nicotinic agonists. *Mol Pharmacol* 51, 499-506.
- Ramos FM, Delgado-Velez M, Ortiz AL, Baez-Pagan CA, Quesada O, Lasalde-Dominicci JA (2016). Expression of CHRFAM7A and CHRNA7 in neuronal cells and postmortem brain of HIV-infected patients: Considerations for HIV-associated neurocognitive disorder. *J Neurovirol* 22, 327-335.
- Rayes D, De Rosa MJ, Sine SM, Bouzat C (2009). Number and locations of agonist binding sites required to activate homomeric cys-loop receptors. *J Neurosci* 29, 6022-6032.
- Reale M, Di Bari M, Di Nicola M, D'Angelo C, De Angelis F, Velluto L, Tata AM (2015). Nicotinic receptor activation negatively modulates pro-inflammatory cytokine production in multiple sclerosis patients. *Int Immunopharmacol* 29, 152-157.
- Rickert KW, Imperiali B (1995). Analysis of the conserved glycosylation site in the nicotinic acetylcholine receptor: Potential roles in complex assembly. *Chem Biol* 2, 751-759.
- Rodgman A, Perfetti T (2013). The chemical components of tobacco and tobacco smoke. 2nd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdes-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, *et al.* (2011). Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 334, 98-101.
- Rubin DT, Hanauer SB (2000). Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12, 855-862.
- Russo P, Cardinale A, Margaritora S, Cesario A (2012). Nicotinic receptor and tobacco-related cancer. *Life Sci* 91, 1087-1092.
- Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, Tracey KJ, Al-Abed Y, Metz CN (2005). Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med* 201, 1113-1123.

- Saviozzi S, Cordero F, Lo Iacono M, Novello S, Scagliotti GV, Calogero RA (2006). Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 6, 200.
- Schaal C, Chellappan S (2016). Nicotine-mediated regulation of nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung adenocarcinoma by E2F1 and STAT1 transcription factors. *PLoS One* 11, e0156451.
- Schedel A, Thornton S, Schloss P, Kluter H, Bugert P (2011). Human platelets express functional alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 928-934.
- Schmidt H, Muller-Werdan U, Hoffmann T, Francis DP, Piepoli MF, Rauchhaus M, Prondzinsky R, Loppnow H, Buerke M, Hoyer D, *et al.* (2005). Autonomic dysfunction predicts mortality in patients with multiple organ dysfunction syndrome of different age groups. *Crit Care Med* 33, 1994-2002.
- Schuller HM, Orloff M (1998). Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 55, 1377-1384.
- Schuller HM, Tithof PK, Williams M, Plummer H (1999). The tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is a beta-adrenergic agonist and stimulates DNA synthesis in lung adenocarcinoma via beta-adrenergic receptor-mediated release of arachidonic acid. *Cancer Res* 59, 4510-4515.
- Schuller HM (2007). Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis. *Prog Exp Tumor Res* 39, 45-63.
- Schuller HM (2009). Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer* 9, 195-205.
- Severance EG, Yolken RH (2008). Novel alpha7 nicotinic receptor isoforms and deficient cholinergic transcription in schizophrenia. *Genes Brain Behav* 7, 37-45.
- Severance EG, Dickerson FB, Stallings CR, Origoni AE, Sullens A, Monson ET, Yolken RH (2009). Differentiating nicotine- versus schizophrenia-associated decreases of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor transcript, CHRFAM7A, in peripheral blood lymphocytes. *J Neural Transm* 116, 213-220.
- Sfera A, Cummings M, Osorio C (2015). Non-neuronal acetylcholine: The missing link between sepsis, cancer, and delirium? *Front Med* 2, 56.
- Sharma G, Vijayaraghavan S (2001). Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4148-4153.
- Sharma G, Vijayaraghavan S (2008). Nicotinic receptors containing the alpha7 subunit: A model for rational drug design. *Curr Med Chem* 15, 2921-2932.
- Shen J, Xu L, Owonikoko TK, Sun SY, Khuri FR, Curran WJ, Deng X (2012). NNK promotes migration and invasion of lung cancer cells through activation of c-src/PKCiota/FAK loop. *Cancer Lett* 318, 106-113.
- Shi D, Guo W, Chen W, Fu L, Wang J, Tian Y, Xiao X, Kang T, Huang W, Deng W (2012). Nicotine promotes proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating alpha7AChR, ERK, HIF-1alpha and VEGF/PEDF signaling. *PLoS One* 7, e43898.
- Shin VY, Wu WK, Ye YN, So WH, Koo MW, Liu ES, Luo JC, Cho CH (2004). Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* 25, 2487-2495.

- Shin VY, Jin HC, Ng EK, Yu J, Leung WK, Cho CH, Sung JJ (2008). Nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induce cyclooxygenase-2 activity in human gastric cancer cells: Involvement of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) and beta-adrenergic receptor signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 233, 254-261.
- Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, Tan J (2004). Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem* 89, 337-343.
- Sine SM, Engel AG (2006). Recent advances in cys-loop receptor structure and function. *Nature* 440, 448-55.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, *y col.* (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *Jama* 315, 801-810.
- Singh S, Pillai S, Chellappan S (2011). Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. *J Oncol* 2011:456743.
- Sinkus ML, Lee MJ, Gault J, Logel J, Short M, Freedman R, Christian SL, Lyon J, Leonard S (2009). A 2-base pair deletion polymorphism in the partial duplication of the alpha7 nicotinic acetylcholine gene (CHRFAM7A) on chromosome 15q14 is associated with schizophrenia. *Brain Res* 1291, 1-11.
- Sinkus ML, Wamboldt MZ, Barton A, Fingerlin TE, Laudenslager ML, Leonard S (2011). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and the acute stress response: Maternal genotype determines offspring phenotype. *Physiol Behav* 104, 321-326.
- Sinkus ML, Graw S, Freedman R, Ross RG, Lester HA, Leonard S (2015). The human CHRNA7 and CHRFAM7A genes: A review of the genetics, regulation, and function. *Neuropharmacology* 96, 274-288.
- Sobel A, Weber M, Changeux JP (1977). Large-scale purification of the acetylcholine-receptor protein in its membrane-bound and detergent-extracted forms from torpedo marmorata electric organ. *Eur J Biochem* 80, 215-224.
- Son JH, Meizel S (2003). Evidence suggesting that the mouse sperm acrosome reaction initiated by the zona pellucida involves an alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Biol Reprod* 68, 1348-1353.
- Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E433-437.
- Stein PK, Kleiger RE (1999). Insights from the study of heart rate variability. *Annu Rev Med* 50, 249-261.
- Stellman SD, Muscat JE, Thompson S, Hoffmann D, Wynder EL (1997). Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime filter cigarette smoking. *Cancer* 80, 382-388.
- Strathdee G (2002). Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol* 12, 373-379.
- Sumikawa K, Gehle VM (1992). Assembly of mutant subunits of the nicotinic acetylcholine receptor lacking the conserved disulfide loop structure. *J Biol Chem* 267, 6286-6290.
- Szafranski P, Schaaf CP, Person RE, Gibson IB, Xia Z, Mahadevan S, Wiszniewska J, Bacino CA, Lalani S, Potocki L, *y col.* (2010). Structures and molecular mechanisms for common 15q13.3 microduplications involving CHRNA7: Benign or pathological? *Hum Mutat* 31, 840-850.

- Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP (2009). Nicotinic receptors: Allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 8, 733-750.
- Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT (2012). PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 249, 158-175.
- Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996). Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 93, 1043-1065.
- Tasneem A, Iyer LM, Jakobsson E, Aravind L (2005). Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal cys-loop ion channels. *Genome Biol* 6, R4.
- Thomas GA, Rhodes J, Ingram JR (2005). Mechanisms of disease: Nicotine--a review of its actions in the context of gastrointestinal disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2, 536-544.
- Thomsen MS, Zwart R, Ursu D, Jensen MM, Pinborg LH, Gilmour G, Wu J, Sher E, Mikkelsen JD (2015). Alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunits form heteromeric receptor complexes that are expressed in the human cortex and display distinct pharmacological properties. *PLoS One* 10, e0130572.
- Timmerman R, Paulus R, Galvin J, Michalski J, Straube W, Bradley J, Fakiris A, Bezjak A, Videtic G, Johnstone D, *et al.* (2010). Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer. *Jama* 303, 1070-1076.
- Tonini G, D'Onofrio L, Dell'Aquila E, Pezzuto A (2013). New molecular insights in tobacco-induced lung cancer. *Future Oncol* 9, 649-655.
- Tracey KJ (2002). The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853-859.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG (2015). WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th ed. Lyon, France: IARC Press.
- Travis W, Brambilla E, Müller-Hermelink K, Harris C (2004). WHO classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon, France: IARC Press.
- Tsurutani J, Castillo SS, Brognard J, Granville CA, Zhang C, Gills JJ, Sayyah J, Dennis PA (2005). Tobacco components stimulate akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells. *Carcinogenesis* 26, 1182-1195.
- Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shukla R (2010). Cholinergic protection via alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and PI3K-akt pathway in LPS-induced neuroinflammation. *Neurochem Int* 56, 135-142.
- US National Library of Medicine. Studying complement inhibition in early, newly developing septic organ dysfunction (SCIENS) ClinicalTrials.gov [Internet]; c2017 [citado 01/04/2017]. Disponible desde: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02246595>.
- van der Zanden EP, Hilbers FW, Verseijden C, van den Wijngaard RM, Skynner M, Lee K, Ulloa L, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ (2012). Nicotinic acetylcholine receptor expression and susceptibility to cholinergic immunomodulation in human monocytes of smoking individuals. *Neuroimmunomodulation* 19, 255-265.
- van Maanen MA, Stoof SP, van der Zanden EP, de Jonge WJ, Janssen RA, Fischer DF, Vandeghinste N, Brys R, Vervoordeldonk MJ, Tak PP (2009). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor on fibroblast-like synoviocytes and in synovial tissue from rheumatoid arthritis patients: A possible role for a key neurotransmitter in synovial inflammation. *Arthritis Rheum* 60, 1272-1281.

- van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, Tracey KJ, van der Poll T (2006). The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology* 130, 1822-1830.
- Vanderlei LC, Pastre CM, Hoshi RA, Carvalho TD, Godoy MF (2009). Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 24, 205-217.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.
- Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G (2004). Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 32, 2329-2331.
- Vida G, Peña G, Deitch EA, Ulloa L (2011). Alpha7-cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine. *J Immunol* 186, 4340-4346.
- Vijayaraghavan S, Schmid HA, Halvorsen SW, Berg DK (1990). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a neuronal acetylcholine receptor alpha-type subunit. *J Neurosci* 10, 3255-3262.
- Villiger Y, Szanto I, Jacon S, Blanchet C, Buisson B, Krause KH, Bertrand D, Romand JA (2002). Expression of an alpha7 duplicate nicotinic acetylcholine receptor-related protein in human leukocytes. *J Neuroimmunol* 126, 86-98.
- Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, *y col.* (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama* 302, 2323-2329.
- Vincent JL, De Backer D, Wiedermann CJ (2016). Fluid management in sepsis: The potential beneficial effects of albumin. *J Crit Care* 35, 161-167.
- Waldburger JM, Boyle DL, Pavlov VA, Tracey KJ, Firestein GS (2008). Acetylcholine regulation of synovocyte cytokine expression by the alpha7 nicotinic receptor. *Arthritis Rheum* 58, 3439-3449.
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, *y col.* (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421, 384-388.
- Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, *y col.* (2004). Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 10, 1216-1221.
- Wang L, Li JG, Jia BH, Wu YB, Zhou Q, Du ZH (2007). Protective effects of electric stimulation of vagus nerve on acute lung injury in rat with sepsis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 19, 593-595.
- Wang W, Chin-Sheng H, Kuo LJ, Wei PL, Lien YC, Lin FY, Liu HH, Ho YS, Wu CH, Chang YJ (2012). NNK enhances cell migration through alpha7-nicotinic acetylcholine receptor accompanied by increased of fibronectin expression in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 19, S580-588.
- Wang Y, Xiao C, Indersmitten T, Freedman R, Leonard S, Lester HA (2014). The duplicated alpha7 subunits assemble and form functional nicotinic receptors with the full-length alpha7. *J Biol Chem* 289, 26451-26463.

- Warren GW, Romano MA, Kudrimoti MR, Randall ME, McGarry RC, Singh AK, Rangnekar VM (2012). Nicotinic modulation of therapeutic response in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 131, 2519-2527.
- Wevers A, Jeske A, Lobron C, Birtsch C, Heinemann S, Maelicke A, Schroder R, Schroder H (1994). Cellular distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs in the human cerebral cortex as revealed by non-isotopic in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 25, 122-128.
- Wittebole X, Hahm S, Coyle SM, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF (2007). Nicotine exposure alters in vivo human responses to endotoxin. *Clin Exp Immunol* 147, 28-34.
- Wolf JM, Lashner BA (2002). Inflammatory bowel disease: Sorting out the treatment options. *Cleve Clin J Med* 69, 629-631.
- Wong HP, Yu L, Lam EK, Tai EK, Wu WK, Cho CH (2007). Nicotine promotes cell proliferation via alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine-synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 221, 261-267.
- World Health Organization. Global Health Observatory Data Repository - Prevalence - adult age-standardized Data by country [Internet]; c2015 [citado 01/04/2017]. Disponible desde: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.TOB30011> .
- World Health Organization. Spain Smoking Prevalence and Tobacco Economy [Internet]; c2002 [citado 01/04/2017]. Disponible desde: <http://www.who.int/tobacco/media/en/Spain.pdf?ua=1> .
- Xu L, Deng X (2006). Protein kinase ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. *J Biol Chem* 281, 4457-4466.
- Yasui DH, Scoles HA, Horike S, Meguro-Horike M, Dunaway KW, Schroeder DI, Lasalle JM (2011). 15q11.2-13.3 chromatin analysis reveals epigenetic regulation of CHRNA7 with deficiencies in rett and autism brain. *Hum Mol Genet* 20, 4311-4323.
- Yebenes JC, Ruiz-Rodriguez JC, Ferrer R, Cleries M, Bosch A, Lorencio C, Rodriguez A, Nuvials X, Martin-Loeches I, Artigas A, y col. (2017). Epidemiology of sepsis in catalonia: Analysis of incidence and outcomes in a european setting. *Ann Intensive Care* 7, 19.
- Yoshida Y, Kumar A, Koyama Y, Peng H, Arman A, Boch JA, Auron PE (2004). Interleukin 1 activates STAT3/nuclear factor-kappaB cross-talk via a unique TRAF6- and p65-dependent mechanism. *J Biol Chem* 279, 1768-1776.
- Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, Nara K, Atou K, Takada E, Kamochi H, Suzuki N (2006). Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. *Clin Exp Immunol* 146, 116-123.
- Yuge K, Kikuchi E, Hagiwara M, Yasumizu Y, Tanaka N, Kosaka T, Miyajima A, Oya M (2015). Nicotine induces tumor growth and chemoresistance through activation of the PI3K/akt/mTOR pathway in bladder cancer. *Mol Cancer Ther* 14, 2112-2120.
- Zhang C, Ding XP, Zhao QN, Yang XJ, An SM, Wang H, Xu L, Zhu L, Chen HZ (2016). Role of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor in nicotine-induced invasion and epithelial-to-mesenchymal transition in human non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* 7, 59199-59208.
- Zhang J, Berg DK (2007). Reversible inhibition of GABAA receptors by alpha7-containing nicotinic receptors on the vertebrate postsynaptic neurons. *J Physiol* 579, 753-763.



- Zhang J, Kamdar O, Le W, Rosen GD, Upadhyay D (2009). Nicotine induces resistance to chemotherapy by modulating mitochondrial signaling in lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40, 135-146.
- Zhang Q, Tang X, Zhang ZF, Velikina R, Shi S, Le AD (2007). Nicotine induces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways. *Clin Cancer Res* 13, 4686-4694.
- Zhao YX, He W, Jing XH, Liu JL, Rong PJ, Ben H, Liu K, Zhu B (2012). Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation protects endotoxemic rat from lipopolysaccharide-induced inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 627023.
- Zheng Y, Ritzenthaler JD, Roman J, Han S (2007). Nicotine stimulates human lung cancer cell growth by inducing fibronectin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37, 681-690.
- Zhu BQ, Heeschen C, Sievers RE, Karliner JS, Parmley WW, Glantz SA, Cooke JP (2003). Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell* 4, 191-196.
- Zia S, Ndoye A, Lee TX, Webber RJ, Grando SA (2000). Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 973-981.
- Zoli M, Pistillo F, Gotti C (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 96, 302-311.
- Zon RT, Goss E, Vogel VG, Chlebowski RT, Jatoi I, Robson ME, Wollins DS, Garber JE, Brown P, Kramer BS, *et al.* (2009). American society of clinical oncology policy statement: The role of the oncologist in cancer prevention and risk assessment. *J Clin Oncol* 27, 986-993.
- Zouridakis M, Zisimopoulou P, Poulas K, Tzartos SJ (2009). Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life* 61, 407-423.